



INTER
FACES
CIENTÍFICAS

SAÚDE E AMBIENTE

ISSN IMPRESSO 2316-3313

ISSN ELETRÔNICO 2316-3798

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE OSTRAS *CRASSOSTREA* SPP (MOLLUSCA: BIVALVIA) DOS DOIS MAIORES ESTUÁRIOS DO ESTADO DE SERGIPE POR PCR/RFLP

Daniela Droppa Almeida ¹
Raphael O. Ribeiro ³
Edilson Divino Araújo ⁵

Marivalda Henrique A. Ferreira ²
Ana Carolina Mota Lopes ⁴

RESUMO

As espécies *Crassostrea rhizophorae* e *C. brasiliana* são ostras nativas do estado de Sergipe e desempenham importante papel ecológico no ecossistema manguezal, além de representarem um dos principais produtos de extrativismo. *C. rhizophorae*, conhecida popularmente como “ostra-do-mangue”, considerada de médio porte (10 cm) e a *C. brasiliana*, conhecida como “ostra-de-fundo”, considerada de grande porte (20 cm), apresentam-se similares em sua morfologia e co-ocorrem no ambiente em formas imaturas, contudo quando adultas pouco se sabe sobre esta co-ocorrência entre as espécies, podendo dificultar a identificação e diferenciação entre as espécies. Diante disso o objetivo do trabalho é a identificação molecular das espécies de ostras nativas adultas encontradas nos dois diferentes estuários do estado de Sergipe e verificar a co-ocorrência entre as mesmas. No presente estudo foram utilizadas ostras nativas

adultas do gênero *Crassostrea* coletadas do ecossistema manguezal do litoral sergipano. As 28 amostras de ostras foram coletadas no mês de setembro de 2008, as quais foram retirados os músculos adutores de cada ostra para a extração de DNA total, seguido por ampliações do segmento rDNA 16S e digerido com enzimas de restrição. O produto de amplificação das 28 amostras digerido com a enzima de restrição apresentou o mesmo perfil de restrição, correspondente à espécie *Crassostrea brasiliana*, resultado constatado por meio da comparação do produto da digestão com amostras padrão existente, referente às espécies *C. brasiliana* e *C. rhizophorae*.

PALAVRAS-CHAVE

Rio São Francisco. Rio Vaza Barris. Ostras. *Crassostrea*. *C. brasiliana*.

ABSTRACT

The species *Crassostrea rhizophorae* and *C. brasiliana* are native oysters in the state of Sergipe and play an important ecological role in mangrove ecosystem, furthermore, represent one of the major products of extraction. *C. rhizophorae*, popularly known as “*ostra-do-mangue*” is considered a medium-sized (10 cm) and *C. brasiliana*, known as “*ostra-de-fundo*”, considered a large (20 cm), are similar in morphology and co-occurs in the environment when they are immature. However, as adults little is known about this co-occurrence between the species and may hamper the identification and differentiation between species. Therefore, the aim of this work is the identification of molecular from native oysters species, at adult age, found in two different estuaries in the state of Sergipe and check the co-occurrence between them. In the present study we used *Crassostrea* adult native oysters collected from the coastal mangrove ecosystem in Sergipe. The 28 oyster samples were collected in September 2008, which were taken from the adductor muscle of each oyster for total DNA extraction, followed by amplification of the 16S rDNA segment and digested with restriction enzymes. The amplification product of 28 samples digested with the restriction enzyme had the same restriction profile corresponding to the species *Crassostrea* *Braziliana* the result found by comparing the digestion product samples existing standard, referring to species *C. brasiliana* and *C. rhizophorae*.

KEY WORDS

River São Francisco River Trick Barris. Oysters. *Crassostrea*. *C. brasiliana*.

RESUMEN

La especie *Crassostrea rhizophorae* y *C. brasiliana* son las ostras nativas en el estado de Sergipe y juega un importante papel ecológico en los ecosistemas de manglares, así como la representación de un producto principal de la extracción. *C. rhizophorae*, conocido popularmente como “*ostra del pantano*” es considerada una de tamaño mediano (10 cm) y *C. brasiliana*, conocido como considera de gran tamaño (20 cm) de pantalla “*ostras de fondo*” es similar en morfología y co -ocurren en el ambiente en formas inmaduras, sin embargo, como adultos, se sabe poco acerca de este co -ocurrencia entre especies, lo que puede dificultar la identificación y diferenciación entre las especies. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es la identificación de las especies moleculares de ostras nativas adultos que se encuentran en dos estuarios diferentes en el estado de Sergipe y verificar co -ocurrencia entre ellos. En el presente estudio de adultos ostión *Crassostrea* nativa obtenida de los ecosistemas de manglares Sergipe costa fueron utilizados. Las 28 muestras de ostras se recogieron en septiembre de 2008, que fueron retirados del músculo aductor de cada ostra para la extracción de ADN total, seguido de la amplificación del segmento 16S rDNA y se digirió con enzimas de restricción. El producto de amplificación de 28 muestras digeridas con la enzima de restricción tenía el mismo perfil de restricción correspondiente a la especie *Crassostrea* *Braziliana* el resultado encontrado comparando el producto de las muestras de digestión estándar existente en referencia a las especies *C. brasiliana* y *C. rhizophorae*.

PALABRAS CLAVE

Rio Sao Francisco. Rio Vasa Barris. Ostras. *Crassostrea*. *C. brasiliana*.

1 INTRODUÇÃO

O estado de Sergipe é composto por dois estuários de grande porte, o rio São Francisco que é responsável pela maior parte da deposição de sedimentos no litoral sergipano e pode ser considerado o principal rio da região Nordeste. Entretanto, o rio Vaza Barris também é bastante representativo, especialmente pelo ecossistema manguezal que ocupa a maior parte de sua região estuarina. Nesses dois estuários existem ostras nativas, as quais estão associadas ao ecossistema manguezal e compõem parte importante do produto do extrativismo das populações ribeirinhas.

As ostras são moluscos bivalves, pertencentes à família Ostreidae (RIOS, 1994), com ampla distribuição geográfica. No Brasil, as ostras nativas encontradas pertencem ao gênero *Crassostrea*, que reúne as ostras de maior interesse econômico em função do valor nutritivo e do uso da concha como matéria-prima na fabricação de produtos industriais e medicinais (COSTA, 1985). A ostra é considerada um organismo de alto valor nutritivo devido ao teor de minerais (fósforo, cálcio, ferro e iodo), vitaminas (A, B1, B2, C e D) glicogênio e proteínas (WAKAMATSU, 1973).

No litoral sergipano, as espécies nativas *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea brasiliiana* são consumidas e comercializadas pela população local. A *C. rhizophorae*, conhecida popularmente como “ostra-da-pedra”, ou “ostra-do-mangue”, por estar fixada nas raízes aéreas de plantas do mangue – *Rhizophora mangle* (NASCIMENTO, 1983), ocorre na região de entre-marés e pode atingir até 10 centímetros de altura. Já a espécie *C. brasiliiana*, conhecida como “ostra-de-fundo”, ocorre no infralitoral, sendo considerada uma espécie de grande porte, podendo atingir mais de 20 centímetros de altura. No entanto, nas formas imaturas estas duas espécies podem coocorrer e por apresentarem grande similaridade morfológica torna-se difícil a distinção.

As ostras nativas do Brasil são geralmente referidas como *C. rhizophorae*. No norte e nordeste do país essas ostras são cultivadas ou extraídas pelas comunidades pesqueiras. A correta identificação dessas espécies e o conhecimento sobre a sua distribuição é necessário para o manejo efetivo dessas atividades (NASCIMENTO, 1991). As fazendas de ostras estão se tornando cada vez mais frequentes, principalmente no Sul do Brasil. Além disso, a ostra já se espalhou em habitats naturais da América do Sul, levantando preocupações sobre os impactos ambientais desta espécie na região introduzida (ESCAPA et al., 2004).

Monitorização da presença de diferentes espécies de ostras em habitats naturais não é uma tarefa simples, devido a difícil diferenciação entre as espécies (PIE et al., 2006). Características morfológicas, tais como cor da concha, forma, estrutura, cicatriz são altamente influenciadas pelo ambiente em que vivem (IGNACIO et al., 2000), acarretando, assim, grandes problemas na sistemática de ostras (GUNTER, 1951). Contudo, o advento da biologia molecular traz novas ferramentas capazes de identificar a variedade de espécies de ostras em estuários, assim como sua distribuição geográfica (JOZEFOWICZ & O’FOIGHIL, 1998; IGNACIO et al., 2000; LAPE’GUE et al., 2002).

Apesar do desenvolvimento das técnicas de identificação molecular de espécies do gênero *Crassostrea* nos últimos anos, nenhum trabalho foi realizado visando a comparação e a prevalência entre as espécies de ostras encontradas nos diferentes estuários do estado de Sergipe. Baseado nessas informações, o objetivo desse trabalho foi fazer a identificação molecular das ostras presentes nos dois maiores estuários do estado de Sergipe.

2 MÉTODO

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 28 amostras de ostras, sendo 14 espécimes do município de Brejo Grande/SE provenientes do rio São Francisco (10° 25' 46" S, 36° 27' 58" O) e 14 espécimes do município São Cristóvão/SE do rio Vaza-Barris (11° 00' 53" S, 37° 12' 23" O).

Após a coleta essas espécimes foram encaminhadas ao laboratório de Biologia molecular onde foram realizadas uma parte das análises, logo foram retirados os músculos adutores de cada ostra, conservados em álcool 70% e armazenados em micro tubo de 2 mL no freezer à -20°C. Foram submetidas à extração com protocolo de fenol-clorofórmio (SAMBROOK & RUSSEL, 2001 e MARQUES, 2003) modificado.

PCR/RFLP

As condições de amplificação e digestão foram realizadas no **LEMPE-Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva situado na Universidade Federal do Paraná**. Para a amplificação da região 16S do DNAr foram usados os seguintes oligonucleotídeos: Foward (5'- CGCCTGTTTATCAAAAACAT- 3') e Reverse (5'- CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3'). A reação de amplificação teve um volume total de 25 µL, sendo composta por (1x) buffer (Invitrogen®), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 0,5 mM dNTPmix (Biotools®), 2,5

U Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®), 2,0 µM de cada primer e 60 ng do DNA total. Um controle negativo (ausência de amostra de DNA) foi incluso em cada processo de amplificação.

Nas seguintes termociclagens: 4 min. a 94°C, seguidos de 32 ciclos de 94° por 30s, 56°C por 40s e 1 min. a 72°C.

DIGESTÃO ENZIMÁTICA (RFLP)

A tipagem molecular dos produtos de amplificação da região 16S do DNAr foi realizada segundo a metodologia do PIE *et al.* (2006).

O produto de PCR foi submetido à digestão com a enzima *HaeIII* de *Escherichia coli*, em um volume final de 10 µL, sendo 2 µL de ddH₂O, 0,5 µL de tampão RE 1 X (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM KCl, 0,1mg/mL BSA, pH 8,5; Biotools®), 0,5 µL da enzima *HaeIII* e 7 µL de DNA amplificado. A digestão ocorreu a 37° C por 2h. Os fragmentos esperados tinham 235 pb (*C. Brasiliana*) ou 261 pb (*C. rhizophorae*).

Por fim, os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 3%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A figura 1 corresponde a região 16S do DNAr amplificado, onde todas as amostras apresentaram peso molecular igual, com cerca de 506 pb. Posteriormente, na figura 2, as amostras digeridas com a enzima *HAEIII* apresentaram um mesmo perfil de restrição, e em função da comparação com amos-

tras padrões existentes no LEMPE, referentes às espécies *C. brasiliana*, *C. rhizophorae* e *C. gigas*, pode-se constatar que tanto as amostras oriundas do Rio São Francisco como as do Vaza Barris referem-se à espécie *Crassostrea brasiliana*.

Figura 1 – Amplificação da região 16S do DNAr. A figura é referente ao produto da amplificação, os quais se apresentam homogêneos, apresentando cerca de 506 pares de bases; onde MM se refere ao marcador molecular e 1 ao 3 as amostras provenientes do rio vaza barris e de 4 a 6 as amostras provenientes do Rio São Francisco

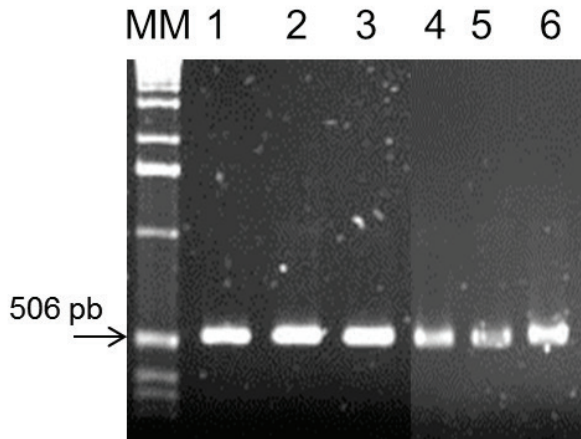
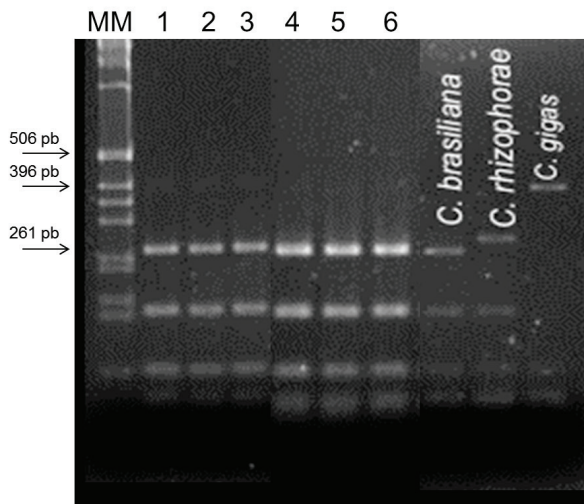


Figura 2 – RFLP – da região 16S do DNAr. A figura representa o produto pós digestão com a enzima de restrição HAEIII, o qual apresentou fragmentos com cerca de 261 pares de bases

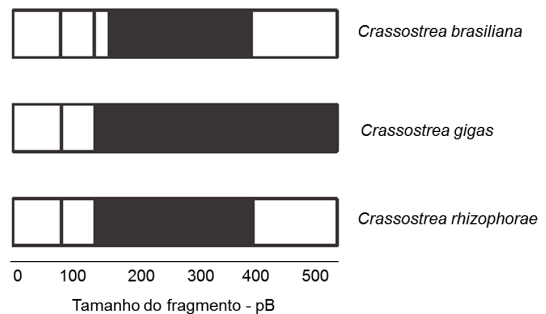


De acordo com Pie e outros autores (2006) o tamanho obtido corresponde a ostras da espécie *C. brasiliana*

A técnica de RFLP mostra resultados consistentes, embora os fragmentos menores não possam ser seguramente detectados em gel de agarose 3%, o maior fragmento de cada espécie (235 pb correspondentes a *C. brasiliana*, 261bp correspondentes a *C. rhizophorae*) (figura 3), são suficientes para a identificação.

No presente estudo foi possível constatar que nas regiões do rio São Francisco e no rio Vaza Barris as espécies de ostras que são encontradas fixadas no mesmo substrato sob formas imaturas, não co-ocorrem nas formas adultas, de acordo com as amostras analisadas dos dois principais estuários do estado de Sergipe.

Figura 3 – Ilustração correspondente ao fragmento 16S do DNAr das três principais espécies de ostras nativas das regiões estuarinas do Brasil. As sequências da espécies *C. gigas* foram obtidas no GenBank (números de acesso: AF280611, AY632550, AJ553905, AJ553904, AJ553903, S66183)



Os fragmentos em preto são os utilizados para a identificação das espécies (PIE *et al.*, 2006).

As ostras da espécie *C. brasiliana* se mostrou mais abundantes na região infra litorânea dos rios Vaza Barris e São Francisco, indicando a ocupação de nichos distintos quando adulta, ocorrendo a coexistência dessas espécies apenas na forma imatura. A utilização do protocolo descrito no presente estudo pode aprimorar os programas de monitoramento de habitats naturais para entender a extensão espacial e temporal da distribuição das ostras em áreas naturais em toda a costa brasileira

(PIE et al., 2006). Além disso, a identificação das sementes de ostras, utilizando métodos moleculares pode permitir uma certificação da identidade das sementes co-

mercializadas, garantindo que as ostras cultivadas estão em ambientes favoráveis para o seu crescimento e maturação, evitando prejuízos aos criadores dessas espécies.

REFERÊNCIAS

- COSTA, P.F. Biologia e tecnologia para o cultivo. In: **Brasil**. Ministérios da Marinha. Instituto Nacional de Estudos do Mar - Manual de Maricultura. Rio de Janeiro, Cap.VIII, parte B. Information Division. 1985
- ESCAPA M., ISACCH J.P., DALEO P., ALBERTI J., IRIBARNE O., BORGES M., DOS SANTOS E.P., GAGLIARDINI D.A. & LASTA M. The distribution and ecological effects of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in northern Patagonia. **Journal of Shellfish Research**, Patagônia, v. 23, 2004, p. 765-772.
- GUNTER G.; The species of oysters of Gulf Caribbean and West India Region. **Bulletin of Marine Science**, India, v.1, 1951, p. 40-45.
- 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**, v.136, 2000, p. 987-991.
- JOZEFOWICZ C.J. & O'FOIGHIL D.O.; Phylogenetic analysis of southern hemisphere oysters based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.10, 1998, p. 426-435.
- LAPÉGUE, S.; BOUTET, L.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P. THIRIOTUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16s mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, v. 202, 2002, p. 232-242.
- NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliana* (Lamarck) in South and Central America. In: Menzel, W. (ed.). **Estuarine and marine bivalve mollusk culture**. CRC Press, Boston, USA, 1991, p.125-134.
- NASCIMENTO, I. A. **Cultivo de ostras no Brasil**: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, v. 35, 1983, p. 871-876.
- 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 brasiliana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*: Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, v. 37, 2006, p.1598-1600.
- RIOS, E.; **Seashells of Brasil**. Rio Grande: Furg, 1994.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W.; **Molecular Cloning**: a laboratory manual. **Third edition**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, v.1, 2001.
- WAKAMATSU, T.; A ostra de Cananéia e seu cultivo. In: **Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista e Instituto Oceanográfico – USP**. Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista/ Instituto Oceanográfico USP, 1973, p.141.

1 Graduada em Ciências Biológicas licenciatura plena (2008), mestre em Biotecnologia Industrial (2013). Tem experiência em microbiologia, biologia molecular (PCR, RFLP, RAPD, Clonagem), proteômica (géis SDS-PAGE e Western Blotting), cultura de células (esplenócitos) e ELISA. Atualmente, trabalha com os temas: produção de vacinas de segunda e terceira geração para Linfadenite Caseosa (LC), Kit diagnóstico sorológico por Elisa para LC, produção de goma xantana - potencial aplicação na área da saúde (utilização como adjuvante para vacinas), relação entre a microbiota bucal e o câncer de boca. E-mail: danieladroppa@gmail.com

2 Graduada em Ciências biológicas (2007)

3 Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Paraná (2004) e mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela Universidade Federal do Paraná (2008). Recentemente, é doutorando da Universidade de Auburn

4 Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Tiradentes - UNIT/SE (2002). Bacharel em Biomedicina pela Universidade Tiradentes - UNIT/SE (2003). Especialista em Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas pela Universidade Federal de Lavras/MG - UFLA (2004). Mestre em Saúde e Ambiente pela Universidade Tiradentes - UNIT/SE (2010).

5 Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás (1994), mestre em Biologia com área de concentração em Genética pela Universidade Federal de Goiás (1997) e doutor em Ciências Biológicas com área de concentração em Zoolo-
gia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2002)

Recebido em: 30 de Julho de 2013
Avaliado em: 7 de Agosto de 2013
Aceito em: 28 de Novembro de 2013
