



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**O SISTEMA DE ACASALAMENTO GENÉTICO NO BLACK-  
STRIPED PIPEFISH, *Syngnathus abaster* (RISSO, 1827) NA RIA  
FORMOSA, REVELADO POR MICROSSATÉLITES**

Mestrado em Biologia Marinha  
Especialização em Biotecnologia Marinha

Jandir João Lima dos Reis

2010





**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**O SISTEMA DE ACASALAMENTO GENÉTICO NO BLACK-  
STRIPED PIPEFISH, *Syngnathus abaster* (RISSO, 1827) NA RIA  
FORMOSA, REVELADO POR MICROSSATÉLITES**

Mestrado em Biologia Marinha  
Especialização em Biotecnologia Marinha

Jandir João Lima dos Reis

Dissertação Orientada por:  
Professora Doutora Ester Serrão

Co-Orientações de:  
Doutor Onno Diekmann  
Doutor Filipe Alberto

2010



*“Em várias classes de animais ocorrem alguns casos excepcionais, na qual a fêmea, em vez do macho, adquiriu caracteres sexuais secundárias bem pronunciadas, tais como cores mais vivas, maior tamanho, força ou combatividade.”*

*Charles Darwin, 1871*

Dedicatória

*Aos meus queridos pais, João Africano dos Reis e Manuela Maria Lima dos Reis, que tudo fizeram para que eu pudesse ter a oportunidade de hoje cá estar.  
Aos meus irmãos, com carinho*



O conteúdo deste relatório é de exclusiva responsabilidade do autor:

---

Jandir João Lima dos Reis



## **Agradecimentos**

Chegado o momento de finalizar esta dissertação, vejo-me na obrigação moral de dirigir algumas palavrinhas de apreço a todos aqueles que deram o seu precioso contributo para a realização do meu mestrado que culmina com o fechamento de um ciclo e o início de outro nesta árdua mas bela escola que é a vida.

À Professora Doutora Ester Serrão, pelo modo rápido e energético como prontamente aceitou orientar esta tese.

Ao Doutor Filipe Alberto pela orientação e pelas dicas no programa STRand. Ao Doutor Onno Diekmann pela orientação, pela disponibilidade, pelo apoio técnico e pelo companheirismo ao longo deste trabalho.

Ao grupo de Biogeografia, Ecologia e Evolução – BEE, bem como ao CCMar pelas excelentes instalações e boas condições laboratoriais que me disponibilizaram para a realização da minha pesquisa que levou a escrita desta tese.

A Licínia Gouveia pelo apoio prestado durante a colheita das amostras e na transmissão de técnicas laboratoriais, e pela simpatia.

Quero também agradecer todos os técnicos do BEE, especialmente Mirjam Van de Vliet, Ana Ramos (Xana), Néelson Coelho, Davide Reis, Céline Madeira e Catarina Mota, pelo apoio técnico e companheirismo durante este trabalho.

À Professora Doutora Ana Barbosa e a senhora Carla Maria Reis, pelo excelente apoio prestado durante a fase de candidatura, no momento da requisição do visto de entrada em Portugal, e pelo bom acolhimento.

À **ASA, S.A.** - Aeroportos e Segurança Aérea de Cabo Verde que através do Luís Amaro Silva (Associação dos Deficientes Visuais de Cabo Verde – Delegação de São Vicente), me apoiou com um bilhete de passagem no trajecto São Vicente/Sal/Lisboa aquando do início deste mestrado.

Agradeço as minhas primas Dircelene Janeiro e Eunice Melício pelo apoio. A todos os meus Amigos... em especial ao Evandro Pires, Carla Graça, Bráulio Raimundo aqui em Portugal e todos os outros que mesmo longe enviam mensagens de apoio.

A Gláucia G. Pereira pelo apoio técnico prestado no tratamento dos dados com o MS Office Excel 2007.

Agradeço à Glauce G. Pereira pelo carinho, pela dedicação, pela paciência, pelas revisões dos textos e pela companhia na “maratona” final. A tua ajuda foi muito importante, um grande obrigado! A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

Aos meus pais... Obrigado pelo esforço que fizeram para me darem a hipótese de ter esta oportunidade de estar cá e lutar pelo meu objectivo, e me ensinarem que sempre vale a pena lutarmos por aquilo que acreditamos. Sem vocês nada disto seria possível.

# Sumário

Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Figuras .....	xiii
Acrónimos .....	xiv
Resumo .....	xv
Abstract.....	xvi
1 Introdução.....	1
2 Material e Métodos.....	6
2.1 Amostragem .....	6
2.2 Dissecção e preservação .....	6
2.3 Extração de ADN.....	7
2.4 Amplificação do ADN pela Técnica da PCR.....	9
2.5 Electroforese - Verificação dos produtos de PCR em gel de agarose .....	13
2.6 Genotipagem dos produtos de PCR.....	15
2.7 Análise de dados.....	15
3 Resultados e discussão .....	17
3.1 Extração de ADN e Marcação dos alelos .....	17
3.2 Grau de parentesco .....	18
4 Conclusões.....	25
5 Referências Bibliográficas.....	31
6 Anexos.....	36

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Reagentes usados na reacção do PCR duplex 28E6/28E8.....	12
Tabela 2. Genótipos dos 12 pais e das 27 mães amostrados. ....	19
Tabela 3. Lista de indivíduos em função de cada pai.....	36
Tabela 4. Lista de indivíduos em função de cada mãe. ....	42
Tabela 5. Soluções necessárias ao processo de extracção de ADN.....	44
Tabela 6. Soluções necessárias ao processo de Electroforese em gel de agarose .....	45

## Lista de Figuras

Figura 1. Evolução hipotética da bolsa incubadora nos singnatídeos (Herald 1959), demonstrando as radiações independente de Urophori e Gastrophori e a diversificação dos tipos de bolsa.....	1
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Syngnathus abaster</i> em negrito (tal como apresentado por Dawson, 1986) .....	3
Figura 3. Resumo das principais fases do comportamento de corte e acasalamento: (A) natação vertical, (B) passagem, (C) natação paralela e (D) desova (Silva, 2008).....	4
Figura 4. Localização do local de amostragem (Foto: Google Earth, 2009).....	6
Figura 5. Localização do tecido caudal usado na extracção de ADN (seta vermelha).....	8
Figura 6. Representação gráfica dos ciclos de temperaturas efectuados na reacção de PCR.....	10
Figura 7. Esquema ilustrativo dos resultados da reacção de PCR durante os três primeiros ciclos. Os iniciadores são representados pelas cores Vermelho ( <i>forward</i> ) e preto ( <i>reverso</i> ). As moléculas verdes e amarelos são as cópias da região amplificável do ADN (CF, 2010).....	11
Figura 8. a) Tina de electroforese em gel de Agarose. b) Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ With Image Lab™ Programa (BioRad), sistema de foto-documentação dos géis por exposição a luz UV. ....	14
Figura 9. Visualização dos produtos de PCR no gel de agarose. ....	15
Figura 10. Visualização no programa STRand® dos picos correspondentes aos Loci 28E6 e 28E8 genotipados para um indivíduo heterozigótico em ambos os Loci.....	18
Figura 11. Amostra do programa Excel com a base de dados importada do programa STRand®.....	19
Figura 12. Exemplo do uso das funções “MÁXIMO” e “SE” para a atribuição da contagem dos alelos e a determinação de parentesco.....	20
Figura 13. O uso de filtros para a obtenção da lista de indivíduos em função de um progenitor. ....	21
Figura 14. Teste de maternidade. Percentagem de correspondência entre descendentes e fêmeas amostradas.....	22
Figura 15. Uso da tabela dinâmica para a obtenção das listas de indivíduos em função de cada pai ou mãe.....	23
Figura 16. Frequência dos acasalamentos com sucesso para os machos (A) e as fêmeas (B).....	24

## Acrónimos

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>ADNmt</b>	Ácido Desoxirribonucléico Mitocondrial
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BEE</b>	Biogeografia, Ecologia e Evolução
<b>CCMar</b>	Centro de Ciências do Mar do Algarve
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>PCR</b>	Reacção em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
<b>PK</b>	Proteinase K
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UAlg</b>	Universidade do Algarve

## Resumo

A família *Syngnathidae* (pipefish, pipehorses, cavalos-marinhos e dragões do mar), contém 52 géneros e aproximadamente 215 espécies. Os indivíduos desta família exibem uma forma especializada de cuidados parentais, caracterizada por adaptações extraordinárias para o cuidado paternal associado a ocorrência da inversão de papéis sexuais.

Neste presente estudo investigou-se se o *Syngnathus abaster* é monogâmico ou se apresenta múltipla maternidade. Em outras palavras, verificou-se se o *S. abaster* acasalou com mais de uma fêmea dentro de um grupo, assim como se uma única fêmea acasalou com um ou mais machos. Para o cumprimento deste objectivo, foram utilizadas técnicas de extracção de ADN, PCR e marcações com microssatélites que possuem alta variabilidade genética.

Os resultados do presente estudo confirmam que a maternidade múltipla ocorre claramente entre os indivíduos da espécie *Syngnathus abaster* amostrados na Ria Formosa – Portugal, bem como mostram a importância de se utilizar um maior número de marcadores moleculares para a indicação da ascendência com exclusividade,

**Palavras-chave:** *Syngnathus abaster*, cuidado parental, selecção sexual, múltipla-maternidade, ascendência, comportamento reprodutivo

## **Abstract**

The genetic mating system in the black-striped pipefish, *Syngnathus abaster* Risso, 1827, in Ria Formosa, revealed by microsatellite DNA markers.

The family *Syngnathidae* (pipefish, pipehorses, seahorses and sea dragons), contains 52 genera and about 215 species. Individuals of this family exhibit a specialized form of parental care, characterized by remarkable adaptations for paternal care associated with the occurrence of sexual role reversal.

In this work, it was investigated if the *Syngnathus abaster* is monogamous or presents multiple parentages. In other words, it was studied if the *S. abaster* mated with more than one female within a group, as if a single female mated with one or more males. To accomplish this objective, DNA extraction technique, PCR and microsatellite markers with known high genetic variability were used.

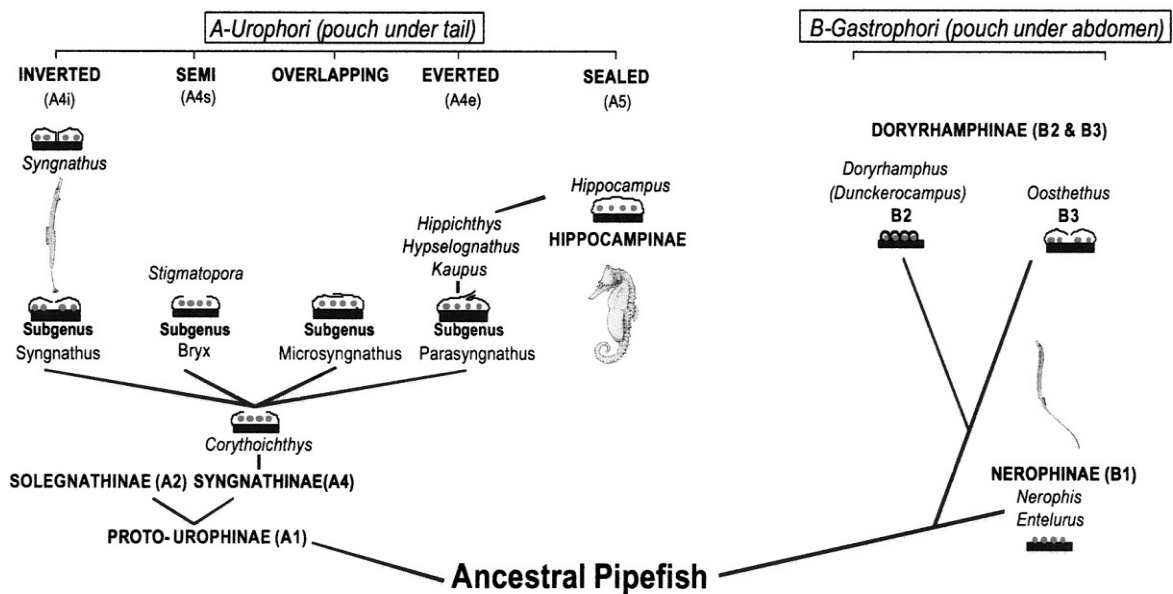
The results confirm that multiple maternity clearly occur between individuals of the species *Syngnathus abaster* sampled in the Ria Formosa – Portugal, and show the importance of using a larger number of molecular markers for indicating the descent exclusively.

**Key words:** *Syngnathus abaster*, parental care, sexual selection, multiple-maternity, parentage, reproductive behaviour

# 1 INTRODUÇÃO

A família *Syngnathidae* (pipefish, pipehorses, cavalos-marinhos e dragões do mar), contém 52 géneros e aproximadamente 215 espécies. A maioria das espécies encontra-se amplamente distribuída nas áreas costeiras da zona tropical às zonas temperadas, com 17 espécies que habitam zonas de água doce e 35 que habitam zonas de água salobra (Nelson, 1994). Os indivíduos desta família exibem uma forma especializada de cuidados parentais, caracterizada por adaptações extraordinárias para o cuidado paternal associado a ocorrência da inversão de papéis sexuais.

Este grupo oferece oportunidades únicas para explorar hipóteses sobre a relação entre investimento parental, os papéis sexuais e a selecção sexual. Com as fêmeas depositando os seus ovos não fertilizados em uma área de incubação especializada localizada no abdómen (Gastrophori) ou na cauda (Urophori) do macho (Monteiro *et al.*, 2005), sendo que a complexidade dessa área varia em cinco tipos: *i*) uma simples área ventral desprotegida onde os ovos ficam colados, *ii*) compartimentos membranosos individuais que recebem o ovo, *iii*) protecção dos ovos em uma bolsa com bolsa de placas, *iv*) bolsa com dobras bilaterais que se tocam na linha média em uma bolsa fechada e *v*) a bolsa incubadora mais complexa e completamente fechada dos cavalos-marinhos (Herald, 1959), como ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Evolução hipotética da bolsa incubadora nos singnatídeos (Herald, 1959), demonstrando as radiações independente de Urophori e Gastrophori e a diversificação dos tipos de bolsa.

Pelo que a ecologia do acasalamento tem merecido um enorme esforço ao nível da investigação científica, principalmente as relações entre a razão sexual operacional e a inversão dos papéis sexuais (Berglund *et al.*, 1986; Jones e Avise, 1997a).

As relações filogenéticas dentro dessa família foram estudadas por Herald (1959), baseado em observações morfológicas, ou seja, a posição ou o método do fechamento da área de incubação, e Wilson *et al.* (2001, 2003), que propôs uma nova filogenia mitocondrial baseada em ADN. Ambas as abordagens concordam que a radiação evolutiva desta família foi seguida por uma diversificação das estruturas envolvidas no cuidado parental, a partir de um ancestral marinho, que provavelmente apresentava uma estrutura incubadora bastante simples. Independentemente do grau de complexidade, todas as estruturas incubadoras dos singnatídeos foram concebidas já com o propósito de proporcionar o desenvolvimento dos embriões, facultando-lhes protecção, nutrição e osmorregulação, (Vincent *et al.*, 1992). Todavia, um estudo anatómico relativamente recente, descreve a morfologia e a ultra-estrutura de três distintas estruturas de incubação, refutando que essa tal estrutura incubadora tenha a uma funcionalidade uniforme, sugerindo que o epitélio tem funções diferentes nos diferentes tipos de estruturas (Carcupino *et al.*, 2002).

Além da “gravidez” do macho, algumas espécies de singnatídeos mostram a inversão de papéis sexuais, com as fêmeas competindo pelo acesso aos companheiros e às vezes apresentando caracteres sexuais secundários visíveis (Monteiro *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006). O investimento energético, a redução da área de incubação e a duração da incubação, actuando isoladamente ou em simultâneo, podem limitar o sucesso reprodutivo das fêmeas, explicando assim as diferenças sexuais (Berglund & Rosenqvist, 2003). Apesar de já terem sido feitas muitas tentativas para identificar claramente os mecanismos por trás da evolução da reversão dos papéis sexuais nos singnatídeos, ainda não foi possível comprovar com precisão a existência de uma relação directa entre os papéis sexuais e qualquer um desses factores (Wilson *et al.*, 2003). A ocorrência múltipla de inversão de papéis sexuais dentro de diferentes clados, exibindo diferentes adaptações dos pais, sugere um processo muito mais dinâmico subjacente às particularidades comportamentais e morfológicas desses peixes.

Os padrões de acasalamento, por sua vez, parecem estar fortemente relacionados com a direcção da selecção sexual, sendo que os singnatídeos que apresentam inversão dos papéis sexuais são poligâmicos ao passo que as espécies com padrões de

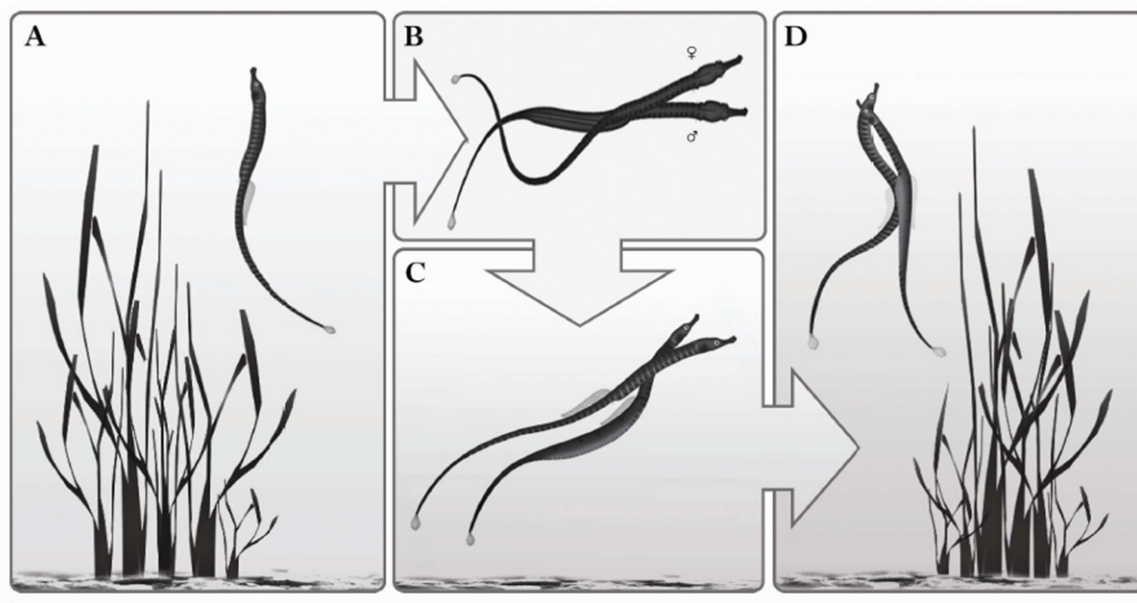
acasalamento competitivos não invertidos são geralmente monogâmicas (Vincent *et al.*, 1992; Avise *et al.*, 2002). Apenas o *Corythoichthys haematopterus* tem sido considerado uma exceção a esta associação, pois, é monogâmico. Entretanto foram feitas observações comportamentais em uma população selvagem que sugerem a inversão de papéis sexuais (Matsumoto & Yanagisawa, 2001).

O **Black-striped pipefish** *Syngnathus abaster* (Risso, 1827) é um pequeno peixe eurialino com uma área de distribuição restrita, que inclui o Mediterrâneo e o Mar Negro, do norte ao sul da Baía de Biscaia (norte da Espanha) (Figura 2). Ele pode ser encontrado tanto em áreas costeiras ou em água salgada e doce (Cakic *et al.*, 2002), principalmente em substrato arenoso, lama ou nos prados de ervas marinhas, entre profundidades de 0,5-5 metros, dentro de uma faixa de temperatura de 8-24 °C (Dawson, 1986; Froese & Pauly, 2010; Riede, 2004).



**Figura 2.** Distribuição geográfica de *Syngnathus abaster* em negrito (tal como apresentado por Dawson, 1986)

Os machos podem ser facilmente distinguidos das fêmeas devido a presença da bolsa ventral (marsúpio), localizada na cauda, formada por duas pregas de pele que entram em contacto na linha mediana do corpo através das suas extremidades livres (Herald, 1959). A cópula longa e ritualizada precede a dança mútua em todas as Marinhas. Em *S. abaster* a fêmea transfere os ovos para uma bolsa incubadora debaixo da cauda do macho, onde, em seguida, fertiliza-los (Silva, 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Resumo das principais fases do comportamento de corte e acasalamento: (A) natação vertical, (B) transferência dos ovos, (C) natação paralela e (D) desova (Silva, 2008).

Os estudos sobre o *S. abaster* são escassos e as características do seu ciclo de vida ainda são superficialmente conhecidas. Campolmi *et al.* (1996), Tomasini *et al.* (1991) e Riccato *et al.* (2003) apresentaram dados básicos sobre a reprodução desta espécie e a sua estrutura populacional em três lagoas do Mediterrâneo. Todos os três estudos sugeriram uma vida curta, com apenas uma ou poucas estações reprodutivas. As fêmeas são reprodutores de lote e os machos podem incubar várias ninhadas durante uma época reprodutiva. Outras referências a *S. abaster* são de Carcupino *et al.* (1997), que descreveu a organização ultra-estrutural do epitélio da bolsa incubadora do macho e Cakic *et al.* (2002), que apresentou uma análise biométrica das populações de *S. abaster* experiências comportamentais em aquários por Silva (2008) e alguns comentários generalizados aos singnatídeos com incidência sobretudo em fichas de campo.

As espécies da família *Syngnathidae*, dependem fortemente das ervas marinhas e o habitat destas espécies mostram um declínio acentuado em relação à redução de plâncton vegetal e a destruição do habitat (Baillie *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2009). O habitat das ervas marinhas está em declínio em todo o mundo (Duarte, 2002; Orth *et al.*, 2006), embora alguns estudos têm-se centrado na fragmentação de pradarias e os efeitos sobre a diversidade genética das populações de ervas marinhas, o efeito da redução de habitat na conectividade das populações de espécies associadas tem sido largamente negligenciado.

O desaparecimento de populações de angiospermas marinhas, que a par de outros constituem importantes habitats para os singnatídeos, que assumem um papel multifuncional decisivo nos ecossistemas marinhos (Bell & Harmelin-Vivien, 1983; Almeida, 1994; Nagelkerken *et al.*, 2000), está acontecendo actualmente a um ritmo deveras inquietante. Ainda persistem apenas pequenos focos distantes, cujo futuro é incerto, e simultaneamente o efeito aditivo dos impactos humanos negativos estão a ser cada vez mais sentidos nos estuários e nas zonas costeiras (Powles *et al.*, 1999).

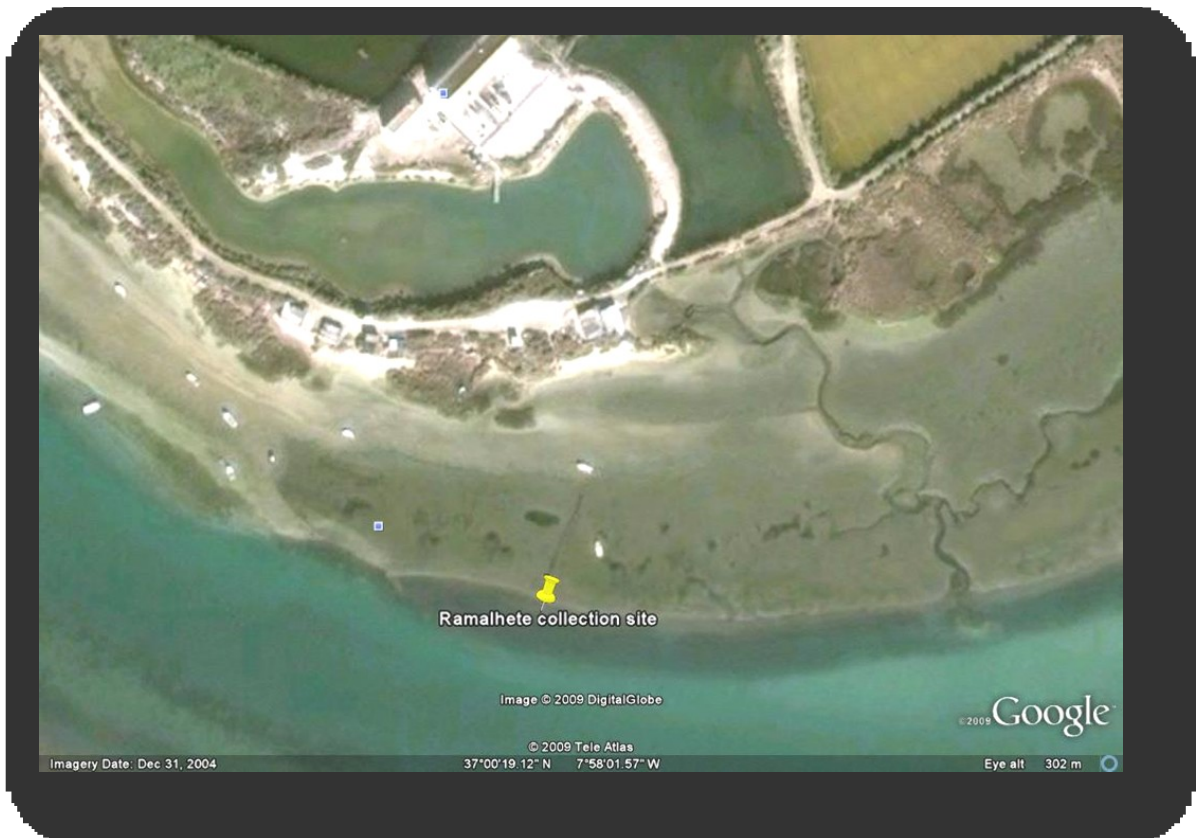
O *S. abaster* está associado principalmente as ervas marinhas e parece restrito aos estuários e lagoas de água salgada como é o caso da Ria Formosa, objecto deste estudo. Os juvenis são libertados em uma fase avançada de desenvolvimento e imediatamente adoptam uma vida bentónica (Silva *et al.*, 2006). Esse comportamento diminui fortemente a capacidade de dispersão e contribui para o isolamento contínuo de populações geograficamente distantes como o aumento da fragmentação de habitats de ervas marinhas. A redução do habitat, o aumento da distância geográfica entre as populações e o comportamento bentónicos dos juvenis, interagem em conjunto e contribuem para reduzir a conectividade entre as populações. Entretanto, não há dados genéticos para confirmar essas previsões. Para o estudo de conectividade e de dispersão, são necessários marcadores genéticos altamente polimórficos.

Neste presente estudo pretende-se investigar se o *S. abaster* é monogâmico ou se apresenta múltipla maternidade. Em outras palavras, pretendeu-se verificar se o *S. abaster* acasalou com mais de uma fêmea dentro de um grupo, assim como verificar se uma única fêmea acasalou com um ou mais machos. Uma vez que é difícil mostrar isso em campo, utilizou-se uma abordagem genética com marcadores genéticos altamente variáveis. Recentemente, foram desenvolvidos marcadores microssatélites para o *S. abaster* segundo Diekmann *et al.* (2009), que são muito úteis na análise de paternidade por causa da sua alta variabilidade genética.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

A amostragem de espécimes de Black-striped pipefish, *S. abaster*, foi realizada em 24 de Julho de 2009 no Ramalhete, no Parque Natural da Ria Formosa, no sul de Portugal (37°00'19,12"N e 7°58'01,57"W) (Figura 4).



**Figura 4.** Localização do local de amostragem (Foto: Google Earth, 2009).

Para a colecta foram utilizadas redes de malha fina encaixadas em cabos telescópicos de 150cm, com as amostras a serem conservadas em uma caixa térmica com água da Ria e gelo (choque térmico) e transportadas até o Centro de Ciências do Mar (CCMar) da Universidade do Algarve (UAAlg).

### 2.2 Dissecção e preservação

No laboratório os indivíduos foram medidos e preservados com Etanol a 96% em tubos plásticos individuais devidamente rotulados (local da colheita, data, identificação dos amostradores), com a atribuição de um número único a cada amostra (p.e. 661, em

que os dois primeiros dígitos correspondem ao número atribuído ao macho grávido, e os dígitos seguintes representam o número do ovo/embrião encontrado dentro do macho). Os indivíduos foram dissecados, com os ovos e os embriões extraídos dos machos a serem dispostos em placas de diluição (contendo álcool) consoante a configuração original observada no interior da bolsa incubadora.

### **2.3 Extracção de ADN**

Os métodos de extracção de ADN combinam processos físicos, químicos e mecânicos fundamentados na lise celular, limpeza (para a eliminação de proteínas, lípidos e ARN) e precipitação.

Para a lise celular usa-se tampões de extracção que contêm detergentes, um composto quelante que retira os catiões da solução desestabilizando assim a membrana celular; TRIS-HCl para manter o pH estável e proteinase K (PK) para degradar as proteínas e enzimas celulares.

A limpeza é efectuada com sais que formam uma capa iónica sobre o ADN protegendo da degradação e, com Ribonuclease (RNase) que elimina o Ácido ribonucleico (ARN) da amostra. A seguir, uma etapa de a centrifugação, permite separar as impurezas (o depósito) do ADN (o sobrenadante).

Posteriormente o ADN é precipitado por reacção e centrifugado novamente. Uma vez precipitado, o ADN foi lavado com um álcool para eliminar todos os sais que permanecem na solução. Por último, elimina-se o álcool com centrifugação e secagem das amostras secarem a temperatura ambiente.

#### *Protocolo de extracção*

O tratamento das amostras para extracção de ADN foi realizado nos laboratórios do grupo de investigação de Biogeografia, Ecologia e Evolução (BEE) do CCMar, no *campus* Gambelas da UAlg. No presente estudo, para a extracção do ADN utilizou-se cerca de 1 cm de tecido (preferencialmente a cauda, ou junto) (Figura 5) que foi cortado para dentro de um tubo de 2 ml, em seguida juntaram-se 500 µl de tampão de extracção (para 10 indivíduos) [2 ml EDTA 0,5M pH8; 7,63 ml H<sub>2</sub>O Elix autoclavada; 100 µl TRIS 1M pH8; 250 µl SDS 20%; 20 µl RNase (10 mg/ml); 50 µl PK (20 mg/ml)] para

incubação a 50-55°C no banho seco em bloco, até o tecido se desfazer totalmente (pode ficar *overnight*).



**Figura 5.** Localização do tecido caudal usado na extração de ADN (seta vermelha).

A extração de ADN foi efectuada pelo método padrão de Sambrook *et al.* (1989) que consiste na adição de 250 µl de Fenol equilibrado e 250 µl de Clorofórmio+Álcool Isoamílico 24:1 misturando devagar e invertendo os tubos durante 10 minutos para homogeneizar a amostra. A seguir, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 10.000 rpm em uma centrífuga refrigerada a 4°C e 400 µl do sobrenadante aquoso foi transferido para um novo tubo identificado.

Neste sobrenadante, procedeu-se a precipitação do ADN da extração por adição de 100 µl de Acetato de Amónia 9M e 1000 µl de Etanol 100% frio e inversão do tubo várias vezes para homogeneizar, seguida de uma incubação *overnight* a -20°C. Realizou-se uma nova centrifugação a 4°C (30 minutos à velocidade máxima de 13.000 rpm) e eliminação do sobrenadante.

O ADN precipitado foi então lavado com 200 µl de Etanol 70% gelado invertendo suavemente o tubo e centrifugado a 4°C (5 minutos à velocidade máxima), ficando, assim, o *pellet* (depósito que contém o ADN) no fundo do tubo.

Procedeu-se a remoção do Etanol sobrenadante e o tubo foi deixado aberto a secar durante alguns minutos no *speedvac* (ou ao ar) para remoção do álcool restante. O *pellet* é ressuscitado em 50 µl H<sub>2</sub>O Mili-Q autoclavada e dissolvido incubando a 50°C

durante 10 minutos. Seguindo-se a quantificação do ADN no Thermo Scientific NandoDrop1000®Spectrophotometer.

## 2.4 Amplificação do ADN pela Técnica da PCR

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reacção em Cadeia pela Polimerase) foi inventada em 1983 por Kary Mullis, que 10 anos depois venceu o prémio Nobel da Química pelo desenvolvimento de um método que permite sintetizar, em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de ADN. Esta técnica faz parte integrante da moderna biotecnologia molecular, tendo promovido uma enorme revolução em áreas como a identificação de *fingerprint* genético (usado em testes de paternidade/maternidade e na medicina forense), a detecção de diagnóstico de doenças infecciosas, a criação de organismos transgénicos, entre outras, além da investigação em Biologia (Biochemicals, 1999; Eguiarte *et al.*, 2007; Falcón e Valera, 2007).

Durante a PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de ADN em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15-30 nucleótidos, obtidos por síntese química (Biochemicals, 1999).

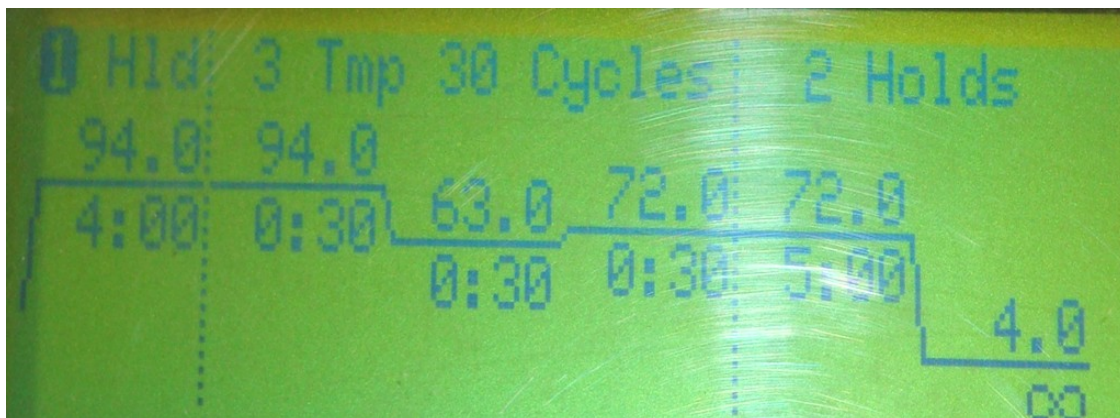
Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de ADN a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a actuação da ADN polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do ADN a amplificar (Biochemicals, 1999).

Para realizar a PCR são necessárias pequenas quantidades do ADN-alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleótidos iniciadores, os quatro desoxinucleótidos constituintes do ADN e o co-factor  $Mg_2^+$ . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação (Figura 6) que consistem em:

- Desnaturação do ADN alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias;
- Associação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao ADN alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reacção é arrefecida

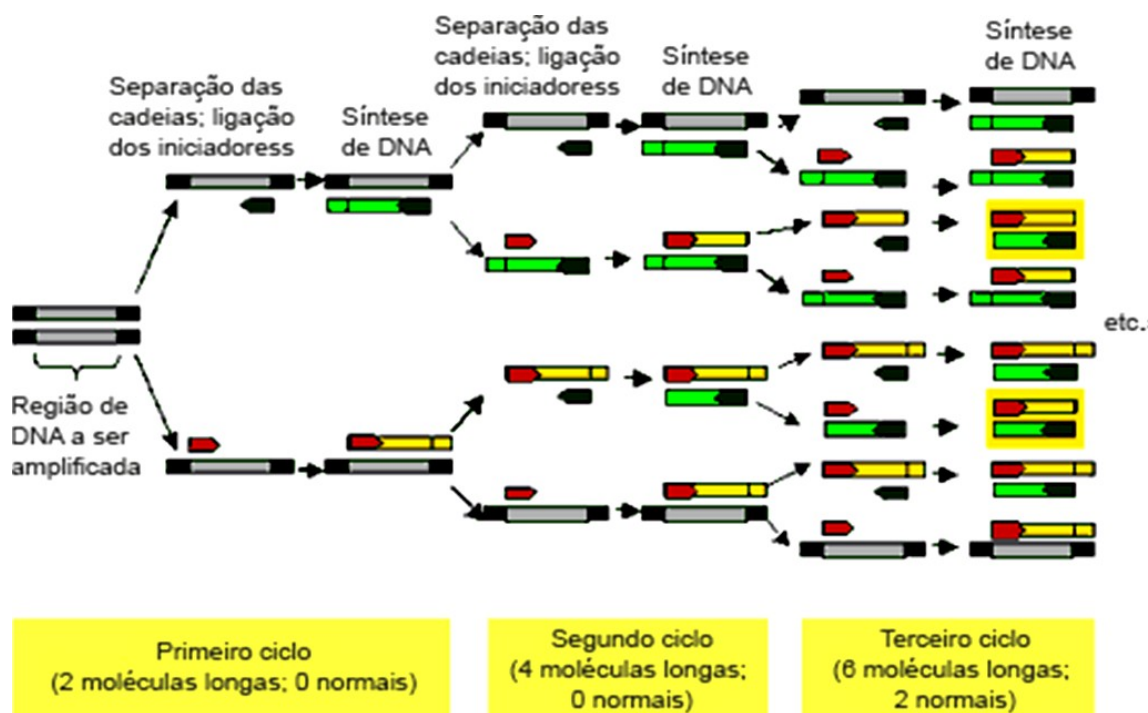
(tipicamente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da % GC da sequência a amplificar);

- Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela ADN polimerase (tipicamente 1 minuto a 72°C);



**Figura 6.** Representação gráfica dos ciclos de temperaturas efectuados na reacção de PCR

O processo envolvendo estes três passos, pode ser repetido várias vezes (25-30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de ADN pré-existente (Figura 7). Em teoria, se for possível levar a cabo 25 ciclos de amplificação seguidos, a concentração de ADN aumentaria 225 milhões de vezes embora, na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento fique por um milhão de vezes (Eguiarte *et al.*, 2007).



**Figura 7.** Esquema ilustrativo dos resultados da reação de PCR durante os três primeiros ciclos. Os iniciadores são representados pelas cores Vermelho (*forward*) e preto (*reverse*). As moléculas verdes e amarelas são as cópias da região amplificável do ADN (CF, 2010).

Como na técnica de PCR se encontram envolvidos vários ciclos de amplificação, foi desenvolvido equipamento que permite programar, de forma contínua e automatizada, os vários ciclos de aquecimento e arrefecimento. Para tal ser concretizável, as ADN polimerases utilizadas deverão ser termoestáveis, tendo tal sido conseguido com o isolamento da ADN polimerase da estirpe termofílica *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polymerase) que actua a temperaturas elevadas levando assim a um aumento da especificidade da reação. De referir ainda que o produto de PCR pode ser visualizado após eletroforese em gel de agarose e o seu tamanho ser estimado por comparação com padrões lineares de ADN (Roche applied Science®).

### *Programa de PCR*

Para o *S. abaster* os *Loci* ampliados foram **28E6** (F:5'-TTCCCCCTAGGACCAATAAAGTATCT-3'; R:5'-TGAGAGTGGTTGCCCTCCAGC-3') e **28E8** (F:5'-ACAA AATGCAAGTGATCCTGTGTAGG-3'; R:5'-TGGTGTGGTGGAACTGAATGACG-3'). Cada *locus* é amplificado utilizando um par de *primers*, em que um deles está marcado com um fluoróforo que permite a sua visualização quando são genotipados pelo sequenciador automático. Neste caso, o *loci* **28E6** estava marcado com um

fluoróforo azul chamado **FAM**, e o *loci* **28E8** estava marcado com um fluoróforo verde chamado **HEX**. Para além de possibilitar a visualização dos *loci*, o fluoróforo permite que consigamos determinar qual o seu tamanho, que poderá ser diferente para cada indivíduo.

Os *Loci* foram amplificados com GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Foram incluídos um controle negativo na amplificação para despistagem de contaminações e um controle positivo para verificar se a PCR funcionou. A reacção de PCR foi realizada a um volume total de 10 µl de acordo com a **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Reagentes usados na reacção do PCR duplex 28E6/28E8.

Reagentes	Concentração do Stock	Para 1 reacção: 10 µl	
		Concentração dos reagentes na Reacção	Volume dos reagentes na Reacção
H <sub>2</sub> O Σ	-	-	3,85 µl
5x Go taq® Flexi Buffer	10 X	1 X	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	0,8 µl
dNTPs	10 mM	0,8 mM	1 µl
Primer F: 28E6	10 mM	0,5 mM	0,5 µl
Primer R: 28E6 Fam	10 mM	0,1 mM	0,1 µl
Primer F: 28E8	10 mM	0,5 mM	0,5 µl
Primer R: 28E8 Hex	10 mM	0,1 mM	0,1 µl
GoTaq® DNA Polymerase	5 U/ml	0,75 U/ml	0,15 µl
DNA	-	-	1 µl
		TOTAL	10 µl

Os ciclos de amplificação foram iniciados com uma desnaturação de 95°C por 6 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, *Anneling* ou ligação dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e extensão com a GoTaq® DNA Polymerase a 72 °C por 1 minuto. A extensão final foi de 20 minutos a 72 °C.

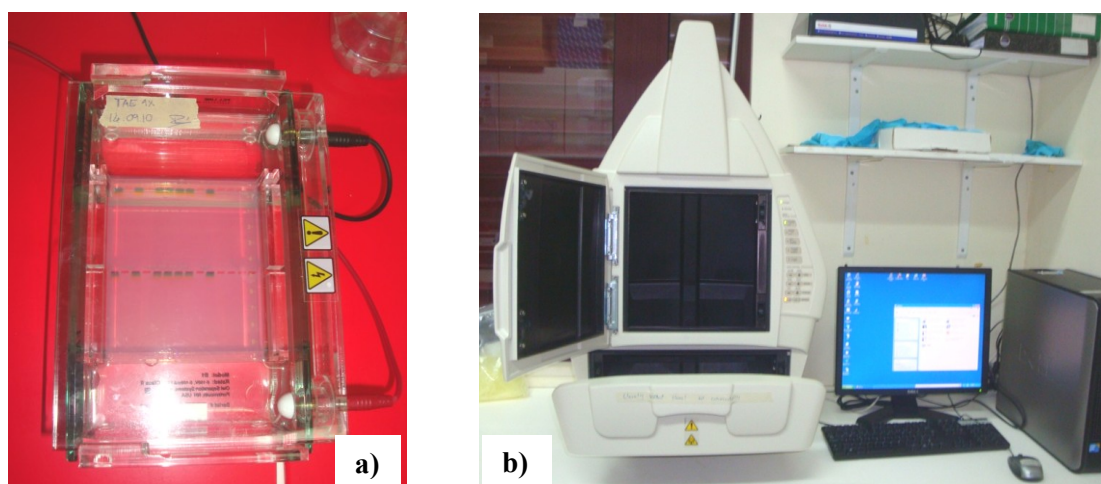
## **2.5 Electroforese - Verificação dos produtos de PCR em gel de agarose**

A electroforese em gel por acção de um campo eléctrico é frequentemente utilizada para separar e estimar o tamanho de fragmentos de ácidos nucleicos. Através da comparação da distância percorrida pelos fragmentos com a percorrida por fragmentos de peso molecular conhecido (padrões de peso molecular) é possível estimar o peso molecular de cada fragmento da amostra a analisar (Asuar, 2007).

A electroforese de ADN é normalmente realizada em gel de agarose. Quando sujeitos a um campo eléctrico, os ácidos nucleicos migram em direcção ao pólo positivo, uma vez que apresentam carga negativa a pH neutro. A agarose funciona como uma rede cujos poros deixam passar mais facilmente as moléculas mais pequenas que migram mais do que as de maiores dimensões. A migração de um fragmento de ADN na forma circular, como é o caso de um plasmídeo não digerido, é diferente da migração do mesmo plasmídeo sob a forma linear (após digestão com uma enzima de restrição). Por outro lado, moléculas com uma conformação mais compacta migram mais rapidamente do que moléculas com uma conformação molecular mais fragmentada (Asuar, 2007).

Depois de preparado, o gel de agarose foi imerso numa tina de electroforese com uma solução tampão que estabelece a condução eléctrica com a fonte de alimentação.

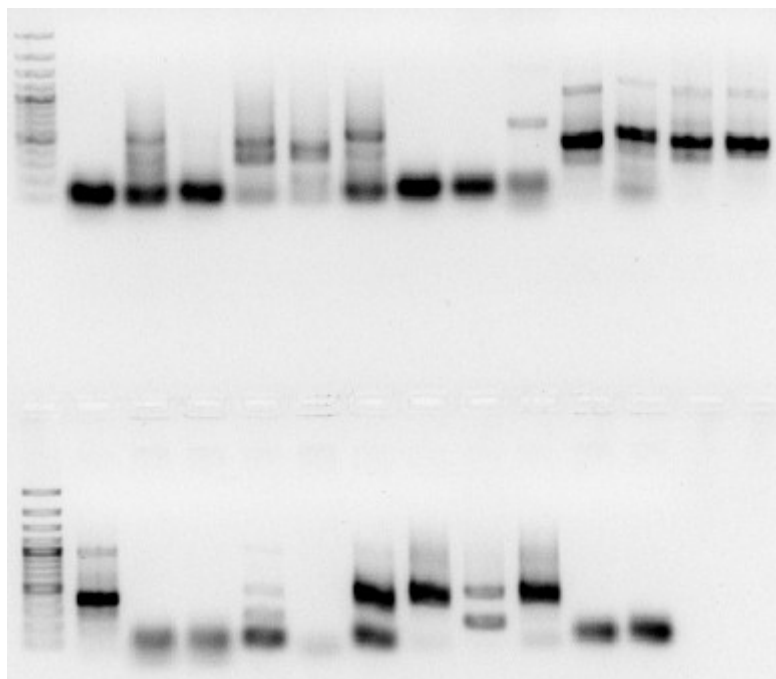
Uma vez aplicadas as amostras de ADN e o padrão de pesos moleculares (*Ladder*) nos poços, iniciou-se a electroforese. A aplicação do campo eléctrico foi efectuada através de 2 eléctrodos situados paralelamente à fileira de poços. Terminada a separação electroforética, o gel deve ser imerso numa solução de Brometo de Etídeo (ou uma solução de TAE 1% com adição de GelRed™ em cada poço) (Tabela 6 em Anexos) que permitiu a visualização das bandas de ADN por exposição a luz ultravioleta (UV) (Figura 8a,b e Figura 9).



**Figura 8.** a) Tina de electroforese em gel de Agarose. b) Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ With Image Lab™ Programa (BioRad), sistema de foto-documentação dos géis por exposição a luz UV.

Os produtos de PCR amplificados nesse estudo foram separados em gel de agarose a 1% e Brometo de Etídeo (10  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ ) a 90V por 30 minutos, seguida da visualização num trans-iluminador de luz ultra-violeta. Também foram separados em gel de agarose a 1% e com a adição de 1  $\mu\text{l}$  de GelRed™ 1:500 a cada poço).

A solução tampão utilizada para a electroforese em ambos os casos foi o TAE a concentração 1X. Os géis foram foto-documentados e o tamanho do fragmento de ADN foi estimado pela comparação com o padrão *Ladder 100bp*.



**Figura 9.** Visualização dos produtos de PCR no gel de agarose.

## 2.6 Genotipagem dos produtos de PCR

As amostras que apresentaram bandas na etapa descrita no item 0 foram preparadas para a genotipagem. A placa multi-poços (com 96 poços) foi mantida sobre gelo seco durante toda a preparação), Em cada poço foram adicionados 1  $\mu$ l do produto de PCR e 9  $\mu$ l do Mix Standard (0,25  $\mu$ l de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard e 8,75  $\mu$ l de Hidi-Formamida). Em seguida fez-se um *spin* para que todo o líquido escorra para o fundo dos poços. As amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos no termociclador. A placa, foi imediatamente colocada em uma caixa com gelo seco e transportada até aos Serviços de Biologia Molecular do CCMar, onde as amostras foram genotipadas no sequenciador ABI prism 3130XL capilar usando o GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems™).

## 2.7 Análise de dados

O tratamento dos dados foi realizado com o uso de três programas de computador especialmente concebidos para a biologia molecular. A análise dos tamanhos dos alelos foi feita com o STRand® (Figura 10), usando o R package® e o MsatAllele (Alberto, 2009), e as ambiguidades foram revistas manualmente. O grau de parentesco foi analisado pelos programas CERVUS3.0® e GERUD1.0® (Genetic Evaluation and

Reconstruction of parental genotypes Using multilocus DNA Data) (Jones, 2001), e com MS Office Excel 2007®.

GERUD1.0® é um programa que reconstrói os parentes de uma descendência. A partir do conhecimento do genótipo de um dos pais (ou até mesmo sem conhecer nenhum deles), o programa consegue encontrar todos os genótipos possíveis que podem representar uma partilha de genes da mãe/do pai entre todos os descendentes. O programa usa um algoritmo exaustivo que testa todos os possíveis genótipos dos pais com o vector de descendência para encontrar o mínimo número de genótipos necessário para explicar a matriz. Esta abordagem permite encontrar o número mínimo de pais/mães, e leva em conta as associações de alelos entre *locus*. Além de determinar número mínimo número de pais/mães, ainda fornece os relatórios com os respectivos genótipos (Jones *et al.*, 2010).

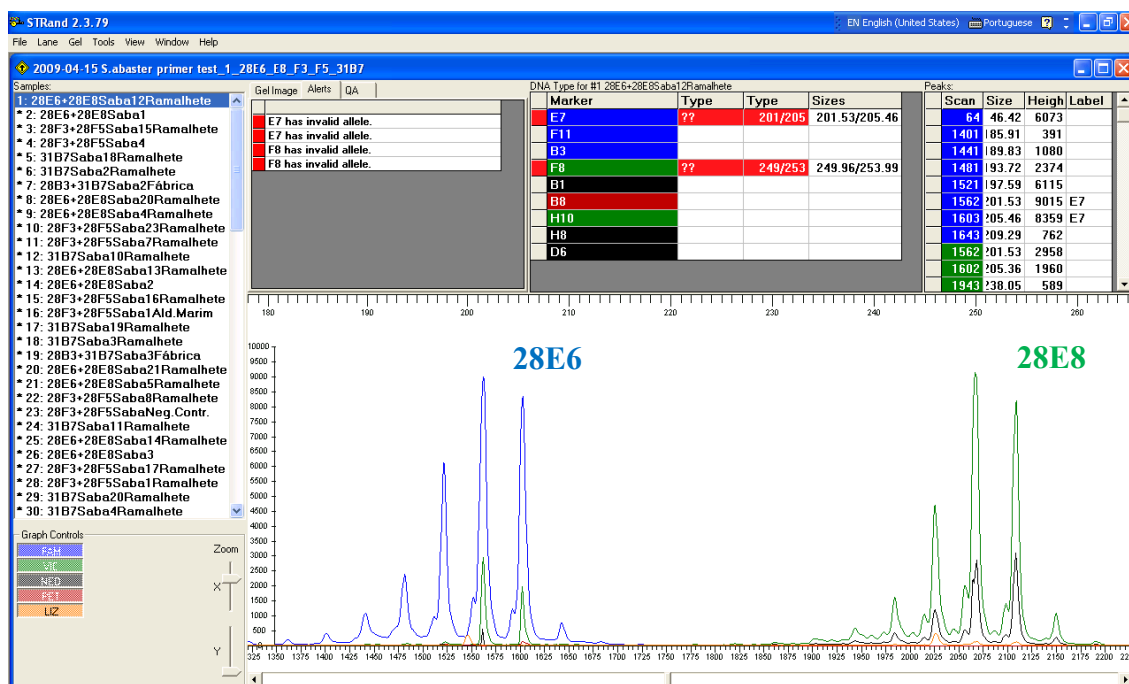
### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Extração de ADN e Marcação dos alelos**

No decorrer da experiência houve algumas dificuldades a quando da amplificação do ADN extraído dos embriões e principalmente dos ovos, porque os microssatélites anteriormente desenvolvidos por Diekmann *et al.* (2009) foram desenhados para actuar com amostras em que a concentração de ADN era grande, como no caso dos indivíduos de *Syngnathus abaster* adultos, mas essa dificuldade foi ultrapassada com a realização de vários testes fazendo variar a concentração do ADN das amostras usadas. De acordo com os resultados obtidos no *ThermoScientific NanoDrop1000® Spectrophotometer*, as amostras tiveram que ser diluídas 1X, 5X, 10X, 15X e 20X para que se pudesse obter resultados satisfatórios.

A electroforese em gel de agarose com Brometo de Etídeo ou com GelRed™, demonstraram bons resultados em ambos os casos, destacando-se a grande melhoria que se registou na qualidade da foto-documentação dos géis proporcionada pela mudança do sistema de imagem do **Electrophoresis Documentation and Analysis System120** (Kodak digital Science™) para o **Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ With Image Lab™**, resultando em imagens mais nítidas e de fácil observação e interpretação.

As dificuldades que ocorreram na amplificação do ADN já descritas, tiveram um grande impacto ao nível da genotipagem, uma vez que sempre que os produtos de PCR não eram positivos perdeu-se algum tempo na repetição dos PCR e posterior análise em gel de agarose. Também, houve casos em que após a genotipagem verificou-se que havia microssatélites cujo sinal se apresentava excessivamente alto ou então muito baixo, obrigando a diluição dos produtos de PCR antes de serem enviados a genotipagem. Na Figura 10, pode-se ver um exemplo do aspecto normal da marcação dos alelos feita no programa STRand®.



**Figura 10.** Visualização no programa STRand® dos picos correspondentes aos Loci 28E6 e 28E8 genotipados para um indivíduo heterozigótico em ambos os Loci.

### 3.2 Grau de parentesco

Na etapa para se determinar o parentesco na amostra, o programa CERVUS3.0® foi testado com os dados deste trabalho. O CERVUS3.0® atribui as probabilidades de parentesco por verosimilhanças, assim como considera possíveis erros da marcação genética e erros de digitação (Marshall *et al.*, 1998). Porém, após a importação dos dados e alguns testes, constatou-se a necessidade de um maior número de dados para o uso apropriado do programa.

Perante isto, foi utilizado o programa GERUD1.0® para a partir do genótipo dos pais conhecidos determinar o número mínimo de mães envolvidas em cada caso, contribuindo para uma matriz de descendentes e permitindo reconstruir os genótipos com base nos dados fornecidos pelos microsatélites.

Com os resultados do GERUD1.0® foi utilizado o programa MS Office Excel® 2007 para a análise das relações de parentesco dentro da amostra.

Primeiramente, após a importação dos dados do programa STRand®, os dados estavam ordenados pela identificação de cada indivíduo (coluna A) e os respectivos alelos (colunas de B a E), como ilustra a Figura 11.

	A	B	C	D	E	F	G
1	<b>Individual ID</b>	<b>28E6a</b>	<b>28E6b</b>	<b>28E8a</b>	<b>28E8b</b>		
2	541	194	221	226	250		
3	545	184	205	226	270		
4	548	198	221	238	270		
5	549	198	221	238	250		
6	5410	198	221	238	250		
7	5411	198	221	231	270		
8	5412	217	221	231	270		
9	5413	217	221	238	250		
10	5414	205	217	231	270		
11	5417	217	221	238	270		
12	5418	217	221	250	270		
13	5420	217	221	231	250		
14	5421	198	221	231	250		
15	5423	217	221	238	250		
16	5425	217	221	238	270		

**Figura 11.** Amostra do programa Excel com a base de dados importada do programa STRand®.

Os dados dos genótipos de pais e mães (Tabela 2) foram tabulados para o uso da função “PROCV”. Desta maneira estabeleceram-se as correspondências entre os alelos dos descendentes com os seus pais e/ou mães.

**Tabela 2.** Genótipos dos 12 pais e das 27 mães amostrados.

	ID	28E6		28E8	
<b>Pai</b>	54	205	221	250	270
<b>Pai</b>	55	178	205	225	274
<b>Pai</b>	56	205	283	203	266
<b>Pai</b>	57	194	271	207	242
<b>Pai</b>	58	205	216	250	282
<b>Pai</b>	60	178	287	138	206
<b>Pai</b>	61	174	213	225	282
<b>Pai</b>	62	166	247	242	274
<b>Pai</b>	64	201	205	241	294
<b>Pai</b>	67	221	308	230	254
<b>Pai</b>	68	194	205	230	250
<b>Pai</b>	72	201	205	262	282
<b>Mãe</b>	24	136	186	134	182
<b>Mãe</b>	25	205	264	254	270
<b>Mãe</b>	26	149	186	241	254
<b>Mãe</b>	27	190	229	270	274
<b>Mãe</b>	28	186	205	222	230

	ID	28E6		28E8	
Mãe	31	194	209	244	262
Mãe	32	209	229	213	254
Mãe	33	178	244	254	272
Mãe	34	209	225	242	282
Mãe	35	189	162	219	262
Mãe	36	213	225	219	244
Mãe	37	194	283	250	254
Mãe	38	205	209	211	251
Mãe	39	169	174	233	274
Mãe	40	189	194	290	294
Mãe	42	186	190	241	254
Mãe	43	197	205	230	262
Mãe	44	194	244	254	282
Mãe	45	190	209	225	260
Mãe	46	229	232	238	254
Mãe	47	190	205	254	262
Mãe	48	170	205	242	286
Mãe	49	194	217	168	238
Mãe	50	190	205	222	234
Mãe	51	213	217	219	286
Mãe	52	161	166	226	241
Mãe	53	194	232	277	286

Para se considerar a presença de pelo menos um alelo de cada marcador, foram atribuídos os números “1” para a presença do alelo (correspondência com o pai ou a mãe) e “0” para a ausência do alelo. Com as funções “MÁXIMO” e “SE” determinou-se o parentesco de cada indivíduo com o progenitor testado (Figura 12).

Desta maneira, todos os pais e todas as mães foram testados contra todos os descendentes amostrados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1				Selecionar Pai/Mãe		54						
2	Individual	28E6a	28E6b	28E8a	28E8b	2	2	2	2	Contar	Pai/Mã	
3	541	194	221	226	250	0	1	0	1	2	54	
4	545	184	205	226	270	0	1	0	1	2	54	
5	548	198	221	238	270	0	1	0	1	2	54	
6	549	198	221	238	250	0	1	0	1	2	54	
7	5410	198	221	238	250	0	1	0	1	2	54	
8	5411	198	221	231	270	0	1	0	1	2	54	
9	5412	217	221	231	270	0	1	0	1	2	54	
10	5413	217	221	238	250	0	1	0	1	2	54	
11	5414	205	217	231	270	1	0	0	1	2	54	
12	5417	217	221	238	270	0	1	0	1	2	54	
13	5418	217	221	250	270	0	1	1	1	2	54	
14	5420	217	221	231	250	0	1	0	1	2	54	
15	5421	198	221	231	250	0	1	0	1	2	54	

**Figura 12.** Exemplo do uso das funções “MÁXIMO” e “SE” para a atribuição da contagem dos alelos e a determinação de parentesco.

Com a aplicação de filtros seguida pela cópia dos dados, foi possível a construção de uma nova base de dados. O filtro na coluna “K” (Figura 13), permite visualizar quais são os descendentes da “mãe 25”, por exemplo.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1				Selecionar Pai/Mãe		25					
2	Individual	28E6a	28E6b	28E8a	28E8b	2	2	2	2	Contar	Pai/Mãe
4	545	184	205	226	270	0	1	0	1	2	25
11	5414	205	217	231	270	1	0	0	1	2	25
175	644	205	233	254	294	1	0	1	0	2	25
176	646	205	275	241	254	1	0	0	1	2	25
269											

**Figura 13.** O uso de filtros para a obtenção da lista de indivíduos em função de um progenitor.

Nesta nova base de dados totalizou-se o valor de 305 correspondências de paternidade e/ou maternidade entre os 266 descendentes, 12 pais e 27 fêmeas amostrados.

Os filtros indicaram que um mesmo indivíduo descendente pode ser apontado com mais de uma mãe. Com isso auxiliaram a confirmar a suspeita de múltipla maternidade, visto que na observação já realizada durante a dissecação dos indivíduos, constatou-se que no interior de um macho estavam sendo incubados descendentes em estados de desenvolvimento bem distintos.

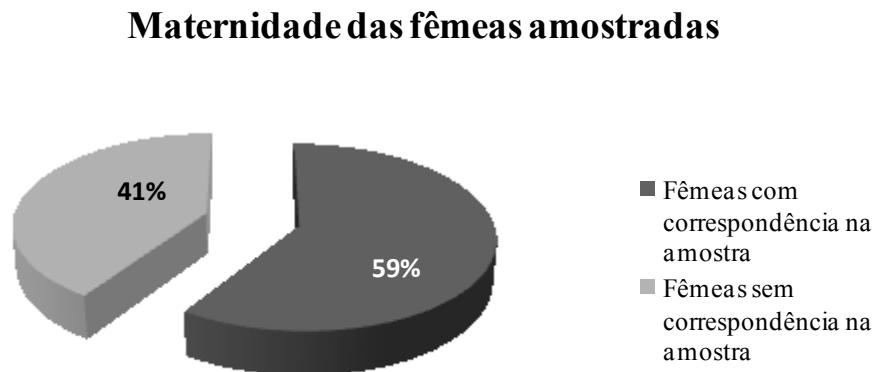
Devido à alelos numericamente iguais em *locus* diferentes, mais de uma fêmea adulta pode vir a ser indicada como a possível mãe de um descendente. A origem desta duplicação/triplicação de maternidade pode ser devido a existência de mutações, alelos nulos, a não ampliação de genes durante a PCR, a selecção dos picos no programa STRand® ou ainda durante o processo de transferência dos dados do STRand® para o programa estatístico R®.

O uso de um maior número de marcadores genéticos, no caso de microssatélites, pode clarificar esses casos em que temos mais de uma mãe possível para um descendente, embora seja pouco relevante neste estudo por se registar pouco casos. Vale ressaltar, que o programa CERVUS3.0® não apontou este facto durante a análise dos dados e que por esta razão, optou-se por fazer uma análise complementar utilizando o programa GERUD1.0®, e os filtros e a tabela dinâmica no Excel. A segunda parte desta análise, semi-manual relativamente as mães, foi possível pelo facto do tamanho da

amostra ser relativamente pequena. Para amostras maiores, recomenda-se testar e validar o uso de programas para a determinação do grau de parentesco.

### **Teste de maternidade**

Dos 266 filhos amostrados, apenas 39 obtiveram correspondência materna com as fêmeas amostradas. Das 27 fêmeas amostradas, 16 eram mães dos indivíduos desta amostra representando 59% (Figura 14, Tabela 4 em anexos).



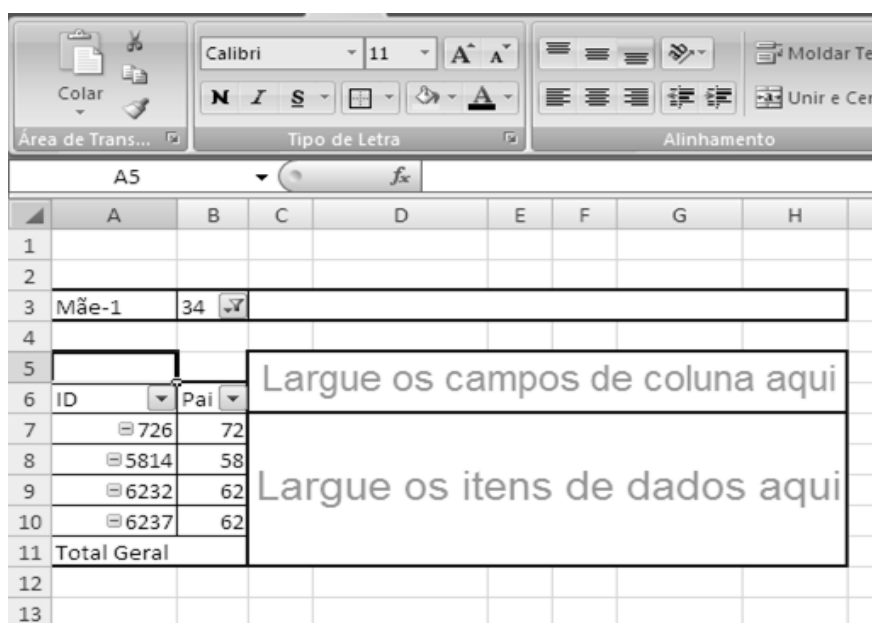
**Figura 14.** Teste de maternidade. Percentagem de correspondência entre descendentes e fêmeas amostradas.

Combinando estas informações, sabemos que a média de descendentes por cada mãe é de 2,4 indivíduos nesta amostra. Porém, o GERUD1.0® estima que pela combinação de alelos os 227 indivíduos sem correspondência materna nesta amostra sejam descendentes de outras 12 fêmeas não amostradas, o que apoia fortemente a ideia de que apesar de a amostragem ter sido feita dentro de uma área relativamente pequena, muito provavelmente foram amostradas mais de uma população em vez da única população inicialmente prevista.

Sugere-se que outros estudos sejam feitos com uma maior amostragem de fêmeas, para se estimar com maior exactidão o número de descendentes de diferentes fêmeas que um macho pode vir a incubar.

### Distribuição de pais e mães

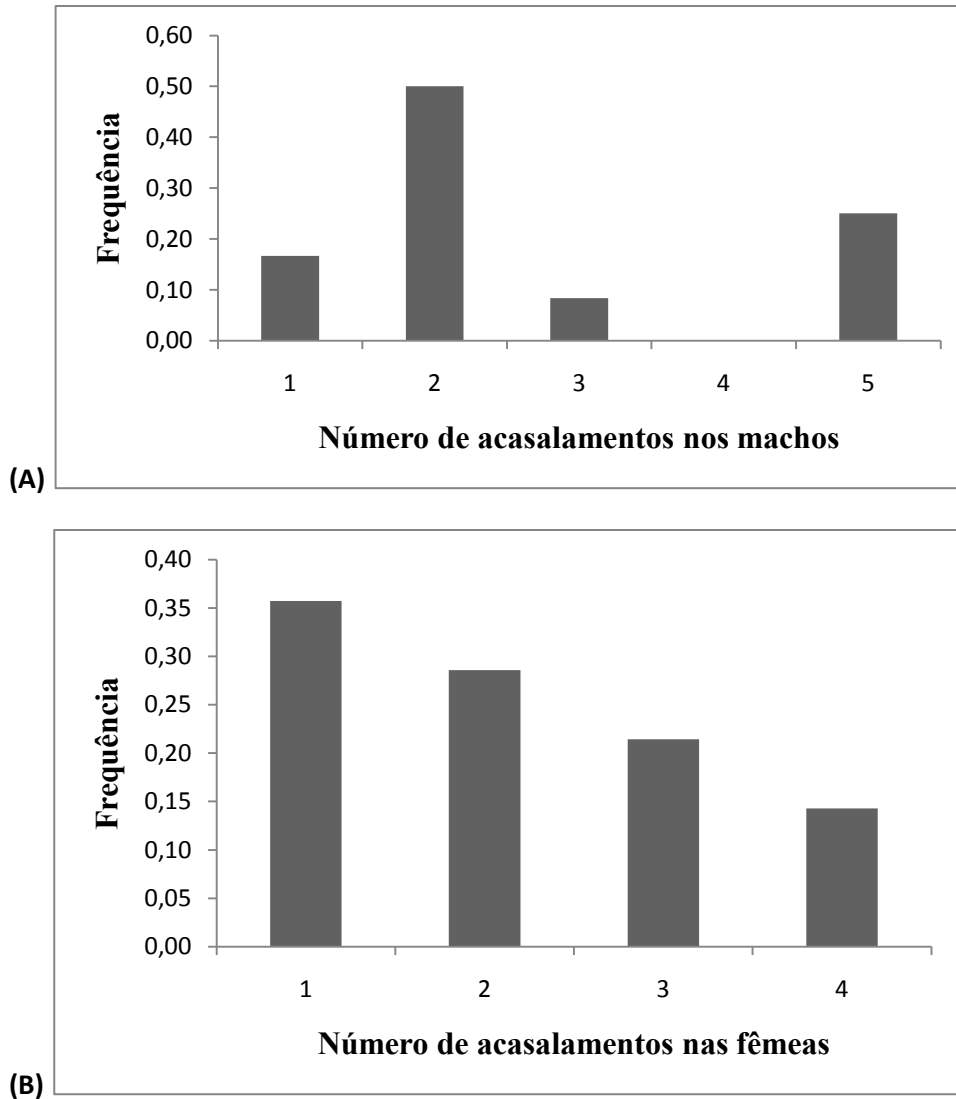
A Figura 15 ilustra o uso da tabela dinâmica para a obtenção de dados. No exemplo, a identificação “ID” e o “Pai” estão dispostos em uma coluna com filtro “Mãe” = 34 aplicado. Desta maneira, tem-se os descendentes da “mãe 34” e os seus respectivos pais. Com informações como esta, construíram-se as Tabelas 3 e 4 (em Anexos).



	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2								
3	Mãe-1	34						
4								
5								
6	ID	Pai						
7	726	72						
8	5814	58						
9	6232	62						
10	6237	62						
11	Total Geral							
12								
13								

**Figura 15.** Uso da tabela dinâmica para a obtenção das listas de indivíduos em função de cada pai ou mãe.

A Tabela 3 (ver Anexos) confirma a existência de maternidade múltipla para 11 das 14 fêmeas que apresentaram correspondência materna com a amostra deste estudo. Pelo que se pode constatar o acasalamento de uma fêmea com um macho, mas também o acasalamento de uma fêmea com 2, 3 e até 4 machos. A frequência e o número dos acasalamentos para os machos e as fêmeas são ilustrados na Figura 16.



**Figura 16.** Frequência dos acasalamentos com sucesso para os machos (A) e as fêmeas (B).

Neste trabalho, a desvantagem do uso do MS Excel® em substituição do programa CERVUS3.0®, é notada principalmente na obtenção dos valores estatísticos de erro e da distribuição da amostra. Embora que os parâmetros apresentados pelo programa CERVUS3.0® são baseados em cálculos estatísticos para grandes populações e um maior número de marcadores, tornando-se pouco eficaz face ao número de indivíduos amostrados neste estudo. Por outro lado, pelo facto de se ter utilizado o programa GERUD1.0® antes do MS Excel® 2007, permitiu obter resultados com um intervalo de confiança de 95%.

Com o GERUD1.0® também foi possível saber que de acordo com os genótipos dos pais conhecidos, há mais 12 fêmeas que contribuíram para a descendência mas que não foram amostradas.

Perante os casos em que existe a probabilidade de termos mais de uma mãe para o mesmo indivíduo, fica patente a importância e a necessidade de se utilizar um maior número de marcadores, pois isso permite confrontar, comparar e clarificar as ambiguidades directamente ligadas ao uso dos microssatélites.

As possíveis razões por um indivíduo ter mais de uma candidata a mãe, são a existência de mutações, alelos nulos (genes não amplificados durante a PCR), erros no momento das marcação dos picos no STRand®, ou então algum erro de conversão durante a passagem dos dados do STRand® para o programa R package® podendo resultar na criação de falsos alelos que os programas CERVUS3.0® e GERUD1.0® consideram como sendo mutações e assim não os considera nas análises de parentesco.

Actualmente, o grupo de pesquisa de Biogeografia, Ecologia e Evolução (BEE) já está a realizar testes com mais 2 microssatélites nos indivíduos usados neste presente trabalho, pelo que se espera obter dados suficientes para clarificar os casos em que são apontadas mais de uma mãe possível para um indivíduo.

Os resultados deste estudo vão de encontro com as constatações de Vincent *et al.* (1992) e de Avise *et al.* (2002) que defendem a poligamia nas espécies de singnatídeos que apresentam inversão dos papéis sexuais, na medida em que ficou provada a existência de poligamia entre as fêmeas de *S. abaster* presentes na Ria Formosa.

Vários autores (Berglund *et al.*, 1988; Vincent *et al.*, 1992, 1995; Jones & Avise, 2001), já tinham dito que entre os singnatídeos os machos podem carregar os ovos de fêmeas diferentes e uma fêmea pode distribuir os ovos maduros, entre muitos parceiros. Berglund *et al.* (1988) apresentaram duas hipóteses para explicar este padrão de distribuição dos ovos:

- Pode ser uma consequência do tempo necessário para a maturação de todos os ovos. Entretanto em *S. abaster*, algumas fêmeas depositam os seus ovos dentro de 24 horas, período de tempo em que os ovos, provavelmente, não têm tempo para amadurecer (Wallace & Selman, 1981).

- É uma tática de adaptação do sexo masculino e/ ou da fêmea, para aumentar a própria sobrevivência ou a dos descendentes.

Segundo Berglund *et al.* (1988), a única explicação aceitável para um macho empenhar-se em acasalamentos múltiplos é com o intuito de evitar receber uma ninhada inteira de uma fêmea com baixa qualidade genética. Nesse contexto, Ahnesjö (1996) refere que um preenchimento parcial do marsúpio pode ser um meio que permite ao macho otimizar a troca entre os custos da procura de grandes fêmeas atraentes e acasalar com outras menores. Se essa for a estratégia, os machos podem ter uma tendência a aceitar menos ovos das fêmeas pequenas, perante a possibilidade da companheira na vizinhança poder ser maior. Portanto, o macho garante alguns descendentes, e reserva um espaço para a eventualidade da fêmea maior aparecer mais tarde (Jones *et al.*, 2000).

Tal como descrito por Silva (2008), os resultados desta tese não mostram diferenças significativas no número de ovos incubados pelos machos da espécie alvo deste estudo, quando acasalam com as fêmeas grandes ou pequenas (Tabela 4). Ao invés, os resultados sugerem que as fêmeas desta espécie (pelo menos as grandes) podem ter um controle aperfeiçoado sobre o número de ovos transferidos, uma vez que possuem uma maior quantidade de ovos para depositarem em vários machos.

Se os machos forem vítimas de predação, uma fêmea corre o risco de perder todos os seus filhos se ela tiver depositado todos os seus ovos em um único parceiro (Berglund *et al.*, 1988; Tomasini *et al.*, 1991). Além disso, torna-se importante minimizar a variação no número de descendentes produzidos ("bet-hedging"), pelo que a distribuição dos ovos entre vários machos talvez seja a melhor estratégia (Berglund *et al.*, 1988).

Berglund *et al.* (1988) e Ahnesjö (1996) também defendem que a dispersão dos ovos entre vários machos pode reduzir a concorrência entre os irmãos no interior do marsúpio do macho, dependente da densidade.

### **Estimativa do tamanho populacional**

Os marcadores moleculares neutros são frequentemente usados para calcular as estimativas indirectas do tamanho efectivo de uma população (Hartl e Clark, 1989). No contexto dos microssatélites baseados em estudos de parentesco, uma medida mais directa do tamanho da população adulta pode ser obtida através de uma "marcação-recaptura" pré-definida (Jones e Avise, 1997b). O procedimento requer uma colecção de

indivíduos vindos directamente da natureza com machos adultos grávidos, as suas proles intactas, e fêmeas adultas, e tem a vantagem que os microssatélites podem combinar fêmeas e ninhadas colectadas separadamente com uma grande precisão. O método pelo qual o tamanho da população adulta é estimado pode ser descrito analogamente a tradicional marcação-recapturar, que são os procedimentos utilizados rotineiramente pelos ecologistas de campo (Pollock *et al.*, 1990).

Segundo o método convencional marcação-recaptura de Lincoln-Peterson, uma amostra inicial de animais  $n_1$  são capturados, marcados e libertados. Uma segunda amostra de animais  $n_2$  depois é capturada, e o número de animais marcados ( $m_2$ ) é registado. Depois obtêm-se uma estimativa do tamanho médio da população através da equação (Pollock *et al.*, 1990):

$$\hat{n} = \frac{(n_1 + 1)(n_2 + 1)}{(m_2 + 1)} - 1$$

e uma variância

$$\widehat{var} \hat{n} = \frac{[(n_1 + 1)(n_2 + 1)(n_1 - m_2)(n_2 - m_2)]}{[(m_2 + 1)^2(m_2 + 2)]}$$

Neste estudo, as “marcas” iniciais foram fornecidas pela inferência dos genótipos das fêmeas que contribuíram para as proles dos machos grávidos. Assim sendo, 28 fêmeas marcaram a si próprias por se terem depositado os seus ovos nos machos amostrados. As 27 fêmeas adultas que foram colectadas e geneticamente analisadas foram consideradas a segunda amostra ou a “recaptura” dos indivíduos marcados.

Por conseguinte, temos  $n_1 = 28$  (o número de fêmeas que marcaram a si mesmas geneticamente),  $n_2 = 27$  (o número total de fêmeas capturadas), e  $m_2 = 16$  (o número de fêmeas com o genótipo conhecido). A aplicação da fórmula de Lincoln-Peterson fornece uma estimativa de  $n = 47$  (com um intervalo de confiança de 95%, 6-90) para o tamanho da população de fêmeas adultas de *S. abaster* na nossa localidade micro espacial. Esse número parece pequeno, mas pode ser plausível devido ao facto que os *pipefish* não são considerados altamente móveis. Naturalmente, que esta estimativa não é equivalente ao tamanho efectivo da população evolutiva ( $N_e$ ), porque a população reprodutora local representada nesta amostra pode ser parte de uma meta-população muito maior composta por muitos desses grupos de melhoramento local ligados entre si por um simples fluxo génico.

Este modelo de marcação-recaptura de Lincoln-Peterson tem na sua base três suposições necessárias para que possa ser aplicada a um estudo genético (Pollock *et al.*, 1990):

***A população está fechada a adições (nascimentos/ imigrantes) e supressões (mortes/ emigrantes)*** - Raramente algum estudo satisfaz completamente esta suposição, embora que neste caso se fosse violada, não mudaria substancialmente as interpretações feitas. Na medida em que qualquer imigração em direcção a população seria sempre de indivíduos não marcados, e a nossa estimativa do tamanho da população permaneceria válida para o tempo da recaptura (Pollock *et al.*, 1990). Por outro lado, as mortes ou as emigrações ocorridas ao acaso em relação aos indivíduos marcados e não marcados não afectam a estimativa do tamanho da população na época de acasalamento.

***Todos os animais têm a mesma probabilidade de serem capturados em todas as amostras*** Se as fêmeas permanecessem perto dos seus companheiros após o acasalamento, o tamanho da população poderia ser seriamente subestimado por este tipo de abordagem. De qualquer maneira, para afectar seriamente os nossos resultados, as fêmeas teriam de permanecer na proximidade dos seus companheiros até que os embriões se desenvolvessem até ao estado em que foram analisados, sendo que provavelmente varia entre alguns dias a duas semanas (Jones e Avise, 1997b). Até agora só foi observada a fidelidade nos cavalos-marinhos (Vincent e Sadler, 1995), enquanto as fêmeas de *S. abaster* parecem mover-se aleatoriamente através de um habitat de ervas marinhas durante a temporada de acasalamento (Vincent *et al.*, 1994). E constata-se isso quando se vê que uma fêmea deposita os seus ovos no interior de vários machos.

***As marcas não são perdidas ou esquecidas*** Essa suposição é inteiramente completamente satisfeita neste estudo, porque todas as fêmeas adultas colectadas foram genotipadas. Assim sendo, na nossa amostra não foi esquecida nenhuma das marcas genéticas.

Uma vez que a estimativa é de 47 fêmeas na população, e como foi observada uma proporção de 1:1 na relação existente entre fêmeas e machos grávidos (27 fêmeas na amostra deste estudo), é de se esperar uma população em idade reprodutiva formada por

94 adultos (sendo 47 indivíduos de cada sexo). Cada macho grávido incubava em média 1,85 ninhadas (onde uma ninhada é considerada um grupo de ovos de uma mãe e um pai). Portanto, é de se esperar que o número total de ninhadas na população a quando da amostragem seja aproximadamente de 87, e o número médio de parceiros por fêmea pode ser 1,85 (obtido pela fração  $87/47$ ).

## 4 CONCLUSÕES

Este estudo realizado na Ria Formosa em Portugal, permitiu clarificar alguns aspectos comportamentais dentro da espécie *Syngnathus abaster*, sendo que os resultados indicam:

Entre os indivíduos amostrados há fêmeas monogâmicas e poligâmicas, pelo que ficou comprovada a existência de múltipla maternidade.

Os vários cruzamentos que ocorreram e a respectiva troca de material genético, originaram uma alta diversidade genética, em uma área geográfica relativamente pequena.

O sistema de acasalamento genético dessa população é poliginândrica, em que tanto os machos como as fêmeas frequentemente têm múltiplos parceiros, durante uma única gravidez masculina.

Na análise do grau de parentesco chegou-se a conclusão que o programa CERVUS3.0® não é adequado para analisar dados resultantes de uma amostra relativamente pequena, como no caso do presente estudo.

O uso dos filtros do Excel evidenciou a importância de se utilizar um maior número de marcadores moleculares para a indicação da ascendência com exclusividade.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahnesjö, I. (1996). Apparent resource competition among embryos in the brood pouch of a male pipefish. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **38**, 167-172.
- Alberto, F. (2009). MsatAllele\_1.0: an R package to visualize the binning of microsatellite alleles. *Journal of Heredity* **100**(3):394-397. DOI:10.1093/jhered/esn110.
- Almeida, A. J. (1994). Macrofauna acompanhante de zosteráceas. Importância na conservação do meio marinho. *Arquivos do Museu Bocage*. pp. 125-144.
- Asuar, L. (2007). Guia prática sobre la técnica de PCR. In L. Eguiarte, V. Souza e X. Aguirre (ed.), *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 5792p.
- Avise, J. C., Jones, A. G., Walker, D. & De Woody, J. A. (2002). Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: lessons for ecology and evolution. *Annual Review of Genetics* **36**, 19-45.
- Baillie, J. E. M., Hilton-Taylor, C. & Stuart, S. N. (2004). *2004 IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom.
- Bell, J. D. & Harmelin-Vivien, M. L. (1983). Fish fauna of French Mediterranean *Posidonia oceanica* seagrass meadows. 2. Feeding habits. *Tethys* **11**, 1-14.
- Berglund A., Rosenqvist G. & Svensson I. (1986). Mate choice, fecundity and sexual dimorphism in two pipefish species (*Syngnathidae*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **19**, 301-307.
- Berglund, A., Rosenqvist, G. & Svensson, I. (1988). Multiple matings and paternal brood care in the pipefish *Syngnathus typhle*. *Oikos* **51**, 184-188.
- Berglund, A. & Rosenqvist, G. (2003). Sex role reversal in pipefish. *Advances in the Study of Behaviour* **32**, 131-167.
- Biochemicals, R. M. (1999). PCR Applications Manual. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim in <http://www.roche-applied-science.com/index.jsp>
- Cakic, P., Lenhardt, M., Mickovic, D., Sekulic, N. & Budakov, L. J. (2002). Biometric analysis of *Syngnathus abaster* populations. *Journal of Fish Biology* **60**, 1562-1569.

- Campolmi, M., Franzoi, P. & Mazzola, A. (1996). Observations on pipefish (Syngnathidae) biology in the Stagnone lagoon (west Sicily). *Publicaciones Especialies Instituto Espanol Oceanografia* **21**, 205-209.
- Carcupino, M., Baldacci, A., Mazzini, M. & Franzoi, P. (1997). Morphological organization of the male brood pouch epithelium of *Syngnathus abaster* Risso (Teleostea, *Syngnathidae*) before, during, and after egg incubation. *Tissue Cell* **29**, 21-30.
- Carcupino, M., Baldacci, A., Mazzini, M. & Franzoi, P. (2002). Functional significance of the male brood pouch in the reproductive strategies of pipefishes and seahorses, a morphological and ultrastructural comparative study on three anatomically different pouches. *Journal of Fish Biology* **61**, 1465-1480.
- Ciência Forense – Blog: <http://cienciaforenseap.blogspot.com/2010/02/fundamentos-da-tecnica-de-pcr.html>> Fundamentos da Técnica de PCR (2010).
- Dawson, C. E. (1986). Syngnathidae. In: Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean (Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L., Hureau, J. C., Nielsen, J. & Tortonese, E., eds), pp. 628-639. Paris: Unesco.
- Diekmann, O. E., Gouveia, L., Serrão, E. A., Van de Vliet, M. S. (2009). Highly polymorphic microsatellite markers for the black striped pipefish, *Syngnathus abaster*. *Molecular Ecology Resources* **9**(6): 1460-1466.
- Duarte, C.M. (2002). The future of seagrass meadows. *Environmental Conservation* **29**, 192-206.
- Eguiarte, L., Souza, V and Aguirre, X. (2007). Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, México, 592p.
- Falcón, L. e Valera, A. (2007). Extracion de ácidos nucleicos. In L. Eguiarte, V. Souza e X. Aguirre (ed.), Ecologia Molecular. Instituto Nacional de Ecología, México, 592p.
- Froese, R. & Pauly, D. (2010). FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), version (9/2010).
- Hartl, D. L, and A. G. Clark (1989). Principles of Population Genetics. Sinauer associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Herald, E. S., 1959. From pipefish to seahorse - a study of phylogenetic relationships. *Proceedings of the Californian Academy of Sciences* **29**, 465-473.

- Hughes, A. R., Williams S. L., Duarte C. M., Heck Jr. K. L., Waycott M. (2009). Associations of concern: declining seagrasses and threatened dependent species. *Frontiers in Ecology and the Environment* **7**. DOI:10.1890/080041.
- Jones, A. G. and Avise, J.C. (1997a). Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. *Molecular Ecology* **6**, 203-213.
- Jones A. G. and Avise J. C. (1997b). Polygynandry in the dusky pipefish *Syngnathus floridae* revealed by microsatellite DNA markers. *Evolution*. DOI:51:1611-1622.
- Jones, A. G, Rosenqvist, G., Berglund, A. & Avise, J. C. (2000). Mate quality influences multiple maternity in the sex-role-reversed pipefish *Syngnathus typhle*. *Oikos* **90**, 321-326.
- Jones, A. G. (2001). GERUD1.0®: A computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multi-locus DNA data. *Molecular Ecology Notes* **1**, 215-218.
- Jones, A. G. & Avise, J. C. (2001). Mating systems and sexual selection in male-pregnant pipefishes and seahorses: insights from microsatellite-based studies of maternity. *The Journal of Heredity* **92**, 150-158.
- Jones, A. G., Small C. M., Paczolt A. K. and N. L. Ratterman (2010). A practical guide to methods of parentage analysis - Technical Review, *Molecular Ecology Resources* **10**, 6-30. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02778.x
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk and J. M. Pemberton (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Matsumoto, K. & Yanagisawa, Y. (2001). Monogamy and sex role reversal in the pipefish *Corythoichthys haematopterus*. *Animal Behaviour* **61**, 163-170.
- Monteiro, N. M., Vieira, N. M. & Almada, V. C. (2002). The courtship behaviour of the pipefish *Nerophis lumbriciformis*: reflections of and adaptation to intertidal life. *Acta Ethologica* **4**, 109-111.
- Monteiro, N. M., Almada, V. C. & Vieira, M. N. (2005). Implications of different brood pouch structures in syngnathid reproduction. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **85**, 1235-1241.
- Nagelkerken, I., Van Der Velde, G., Gorissen, M. W., Meijer, G. J., Van't Hof, T. & Den Hartog, C. (2000). Importance of mangroves, seagrass beds and the shallow

- coral reefs as a nursery for important coral reef fishes, using a visual census technique. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **51**, 31-44.
- Nelson J. S. (1994). *Fishes of the world*, 3rd edn. Wiley, New York.
- Orth R. J., Carruthers T. J. B, Dennison W. C. *et al.* (2006). A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience* **56**, 987-996.
- Pollock, K. H., Nichols, J. D., Brownie, C. and J. E. Hines (1990). Statistical inference for capture-recapture experiments. *Wildl. Monogr.* **107**, 1-97.
- Powles, H., Bradford, M. J., Bradford, R. G., Doubleday, W. G., Innes, S. & Levings, C. D. (1999). Assessing and protecting endangered marine species. *ICES Journal of Marine Science* **57**, 669-676.
- Riccato, F., Fiorin, R., Franco, A., Franzoi, P., Libertini, A., Pranovi, F. & Torricelli, P. (2003). Population structure and reproduction of three pipefish species (Teleostei, *Syngnathidae*) in a seagrass meadow of the Venice Lagoon. *Biologia Marina Mediterrânea* **10**, 138-145.
- Riede, K. (2004). Global register of migratory species - from global to regional scales, Final Report of the R&D-Projekt 80805081. *Federal Agency for Nature Conservation*, Bonn, Germany. 329 p.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> 114 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Silva, C. S. (2008). Reproductive Ecology of the ‘Mildly’ Sex-Role Reversed Pipefish, *Syngnathus abaster*. Tese de Doutoramento em Biologia. Univ. do Porto. 184 p.
- Silva, K., Monteiro, N.M., Almada, V.C. & Vieira, M.N. (2006). Early life history of *Syngnathus abaster* (Pisces: *Syngnathidae*). *Journal of Fish Biology* **68**, 80-86.
- Tomasini, J. A., Quignard, J. P., Capapé, C. & Bouchereau, J. L. (1991). Facteurs du succès reproductif de *Syngnathus abaster* Risso, 1826 (Pisces, Teleostei, *Syngnathidae*) en milieu lagunaire méditerranéen (lagune de Mauguio, France). *Acta Oecologica* **12**, 331-355.
- Vincent, A. C. J., Ahnesjö, I., Berglund, A. & Rosenqvist, G. (1992). Pipefishes and seahorses: are they all sex role reversed? *Trends in Ecology and Evolution* **7**, 237-241.
- Vincent, A. C. J., Ahnesjö, I., Berglund, A. and A. Berglund (1994). Operational sex ratios and behavioural sex differences in a pipefish population. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **34**, 435-442.

- Vincent, A. C. J., and L. M. Sadler (1995). Faithful pair bonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*. *Anim. Behav.* **50**, 1557-1569.
- Vincent, A., Berglund, A. & Ahnesjö, I. (1995). Reproductive ecology of five pipefish species in one eelgrass meadow. *Environmental Biology of Fishes* **44**, 347-361.
- Wallace, R. & Selman, K. (1981). Cellular and dynamics aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist* **21**, 325-343.
- Wilson, A. B., Vincent, A., Ahnesjo, I. & Meyer, A. (2001). Male pregnancy in seahorses and pipefishes (Family Syngnathidae): Rapid diversification of paternal brood pouch morphology inferred from a molecular phylogeny. *The Journal of Heredity* **92**, 159-166.
- Wilson, A. B., Ahnesjo, I., Vincent, A. C. J. & Meyer, A. (2003). The dynamics of male brooding, mating patterns, and sex roles in pipefishes and seahorses (Family Syngnathidae). *Evolution* **57**, 1374-1386.

## 6 ANEXOS

**Tabela 3.** Lista de indivíduos em função de cada pai.

Pai ID	Filho ID	Mãe ID	Total Mães	Mães Conhecidas	Total Filhos	Comprimento (cm)		
	541	37	0	0				
	542	0	0	0				
	543	0	0	0				
	544	0	0	0				
	545	25	0	0				
	546	0	0	0				
	548	0	0	0				
	549	0	0	0				
	5410	0	0	0				
	5411	0	0	0				
	5412	0	0	0				
	5413	49	0	0				
<b>54</b>	5414	25	0	0	3	3	15	8,4
	5415	0	0	0				
	5416	0	0	0				
	5417	49	0	0				
	5418	0	0	0				
	5419	0	0	0				
	5420	0	0	0				
	5421	0	0	0				
	5422	0	0	0				
	5423	49	0	0				
	5424	0	0	0				
	5425	49	0	0				
	5426	0	0	0				
	553	0	0	0				
	555	0	0	0				
	556	0	0	0				
	557	0	0	0				
	5512	0	0	0				
	5513	0	0	0				
	5514	0	0	0				
<b>55</b>	5515	0	0	0	1	0	30	7,8
	5516	0	0	0				
	5517	0	0	0				
	5518	0	0	0				
	5519	0	0	0				
	5520	0	0	0				
	5521	0	0	0				
	5522	0	0	0				
	5523	0	0	0				

5524	0	0	0					
5525	0	0	0					
5526	0	0	0					
5527	0	0	0					
5528	0	0	0					
5529	0	0	0					
5530	0	0	0					
5531	0	0	0					
5532	0	0	0					
5533	0	0	0					
5534	0	0	0					
5535	0	0	0					
5536	0	0	0					
5537	0	0	0					
<hr/>								
561	0	0	0					
562	0	0	0					
563	0	0	0					
564	0	0	0					
565	0	0	0					
567	0	0	0					
568	0	0	0					
569	0	0	0					
5610	0	0	0					
5611	0	0	0					
5612	0	0	0					
5613	0	0	0					
5614	0	0	0					
5615	0	0	0					
5616	0	0	0					
56	5617	0	0	0	1	0	35	8,0
5618	0	0	0					
5619	0	0	0					
5620	0	0	0					
5621	0	0	0					
5622	0	0	0					
5623	0	0	0					
5624	0	0	0					
5625	0	0	0					
5626	0	0	0					
5627	0	0	0					
5628	0	0	0					
5629	0	0	0					
5630	0	0	0					
5631	0	0	0					
5632	0	0	0					
5633	0	0	0					

	5634	0	0	0				
	5636	0	0	0				
	5637	0	0	0				
	<hr/>							
	571	0	0	0				
	572	0	0	0				
	573	49	0	0				
	574	0	0	0				
	577	0	0	0				
	578	49	0	0				
	579	0	0	0				
	5711	0	0	0				
<b>57</b>	5712	49	0	0	2	1	18	6,9
	5714	49	0	0				
	5715	0	0	0				
	5716	0	0	0				
	5718	0	0	0				
	5719	0	0	0				
	5721	0	0	0				
	5722	0	0	0				
	5723	0	0	0				
	5724	0	0	0				
	<hr/>							
	581	0	0	0				
	582	42	47	0				
	583	27	0	0				
<b>58</b>	585	27	0	0	5	5	6	8,2
	586	0	0	0				
	587	0	0	0				
	5814	34	45	0				
	<hr/>							
	601	0	0	0				
	606	0	0	0				
	607	0	0	0				
	6012	0	0	0				
<b>60</b>	6013	0	0	0	2	0	9	7,9
	6014	0	0	0				
	6015	0	0	0				
	6017	0	0	0				
	6018	0	0	0				
	<hr/>							
	612	0	0	0				
	614	0	0	0				
	615	0	0	0				
	616	0	0	0				
<b>61</b>	617	0	0	0	2	0	21	6,8
	618	0	0	0				
	619	0	0	0				
	6110	0	0	0				
	6111	0	0	0				

6113	0	0	0				
6114	0	0	0				
6115	0	0	0				
6116	0	0	0				
6117	0	0	0				
6118	0	0	0				
6119	0	0	0				
6120	0	0	0				
6121	0	0	0				
6122	0	0	0				
6123	0	0	0				
6125	0	0	0				
<hr/>							
621	0	0	0				
622	0	0	0				
625	0	0	0				
626	0	0	0				
627	0	0	0				
628	0	0	0				
629	0	0	0				
6210	0	0	0				
6211	0	0	0				
6213	0	0	0				
6215	0	0	0				
6216	0	0	0				
6217	0	0	0				
6218	0	0	0				
6219	0	0	0				
6220	0	0	0				
6221	0	0	0	5	2	35	8,0
6222	0	0	0				
6223	0	0	0				
6224	0	0	0				
6225	0	0	0				
6226	32	0	0				
6227	0	0	0				
6228	0	0	0				
6229	0	0	0				
6230	0	0	0				
6231	0	0	0				
6232	34	0	0				
6233	0	0	0				
6235	0	0	0				
6236	0	0	0				
6237	34	0	0				
6238	0	0	0				
6239	0	0	0				

	6240	0	0	0				
	641	0	0	0				
	642	0	0	0				
	643	0	0	0				
	644	25	47	0				
	645	0	0	0				
	646	25	47	0				
	647	0	0	0				
	648	0	0	0				
	649	0	0	0				
	6410	0	0	0				
	6411	0	0	0				
	6412	0	0	0				
	6413	0	0	0				
	6414	0	0	0				
	6415	0	0	0				
	6416	0	0	0				
	6417	0	0	0				
	6419	0	0	0				
	6420	0	0	0				
	6421	0	0	0				
<b>64</b>	6423	0	0	0	5	4	32	9,2
	6424	0	0	0				
	6425	0	0	0				
	6426	0	0	0				
	6427	0	0	0				
	6428	0	0	0				
	6429	0	0	0				
	6431	0	0	0				
	6432	0	0	0				
	6433	0	0	0				
	6434	0	0	0				
	6435	0	0	0				
	6436	27	42	0				
	6437	0	0	0				
	6439	0	0	0				
	6440	0	0	0				
	6441	0	0	0				
	6443	0	0	0				
	6446	0	0	0				
	6448	0	0	0				
	6449	0	0	0				
	6451	0	0	0				
	671	50	0	0				
<b>67</b>	673	0	0	0	5	4	33	8,1
	674	0	0	0				

675	50	0	0				
677	27	0	0				
678	27	42	47				
6710	0	0	0				
6711	0	0	0				
6712	42	47	0				
6719	50	0	0				
6720	0	0	0				
6722	0	0	0				
6726	42	47	0				
6727	42	47	0				
6728	0	0	0				
6729	42	47	0				
6730	0	0	0				
6731	42	47	0				
6733	0	0	0				
6734	0	0	0				
6735	0	0	0				
6736	0	0	0				
6737	0	0	0				
6738	0	0	0				
6741	0	0	0				
6742	0	0	0				
6743	0	0	0				
6747	0	0	0				
6749	0	0	0				
6750	42	47	0				
6751	0	0	0				
6752	0	0	0				
6753	0	0	0				
<hr/>							
	681	37	0	0			
	682	0	0	0			
	683	43	50	0			
<b>68</b>	685	0	0	0	3	3	8
	6811	0	0	0			7,4
	6815	0	0	0			
	6816	37	0	0			
	6819	37	0	0			
<hr/>							
	721	51	0	0			
	724	43	47	49			
<b>72</b>	725	0	0	0	5	5	5
	726	34	0	0			8,5
	728	0	0	0			
<hr/>							

**Tabela 4.** Lista de indivíduos em função de cada mãe.

Mãe ID	Filho ID	Pai ID	N.º de Machos Conhecidos	Nº de Filhos	Comprimento (cm)
<b>25</b>	545	54	2	4	7,9
	5414	54			
	644	64			
	646	64			
<b>27</b>	583	58	3	5	8,2
	585	58			
	6436	64			
	677	67			
	678	67			
<b>32</b>	6226	62	1	1	7,5
<b>33</b>	697	69	1	9	7,7
	698	69			
	6910	69			
	6911	69			
	6912	69			
	6913	69			
	6914	69			
	6919	69			
	6922	69			
<b>34</b>	5814	58	3	4	8,6
	6232	62			
	6237	62			
	726	72			
<b>37</b>	541	54	2	4	5,5
	681	68			
	6816	68			
	6819	68			
<b>38</b>	693	69	1	1	6,0
<b>42</b>	582	58	3	9	7,3
	6436	64			
	678	67			
	6712	67			
	6726	67			
	6727	67			
	6729	67			
	6731	67			
	6750	67			
<b>43</b>	683	68	2	2	7,9
	724	72			
<b>45</b>	5814	58	1	1	5,7
<b>47</b>	582	58	4	11	6,2

	644	64			
	646	64			
	678	67			
	6712	67			
	6726	67			
	6727	67			
	6729	67			
	6731	67			
	6750	67			
	724	72			
<hr/>					
	5413	54			
	5417	54			
	5423	54			
	5425	54			
	573	57			
<b>49</b>	578	57	4	11	6,4
	5712	57			
	5714	57			
	691	69			
	692	69			
	724	72			
<hr/>					
	671	67			
<b>50</b>	675	67	2	4	6,6
	6719	67			
	683	68			
<hr/>					
<b>51</b>	721	72	1	1	6,7
<hr/>					

**Tabela 5.** Soluções necessárias ao processo de extração de ADN

**Tampão Extração (para 10 indivíduos)**

- 
- 2 ml EDTA 0,5M pH8
  - 7,63 ml H<sub>2</sub>O Elix autoclavada
  - 100 µl TRIS 1M pH8
  - 250 µl SDS 20%
  - 20 µl RNase (10 mg/ml)
  - 50 µl PK (20 mg/ml)
- 

**Obs:** Misturar tudo e manter à temperatura ambiente.

---

**EDTA 10 mM (pH 8)**

- 
- 4,65 g de Dissodium ethilenediaminetetracetato. 2H<sub>2</sub>O (EDTA)
  - 1000 ml H<sub>2</sub>O ultra pura
- 

**Obs:** Misturar vigorosamente com o agitador magnético. Ajustar o pH a 8 com NaOH (~0,5 g de NaOH em sal). Fazer aliquotas, autoclavar e manter à temperatura ambiente.

---

**TRIS 10 mM (pH 8)**

- 
- 1,36 g de Tris base (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)
  - 800 ml H<sub>2</sub>O ultra pura
  - 42 ml HCl
- 

**Obs:** ajustar a 1000 ml com água ultra pura, autoclavar e manter à temperatura ambiente.

---

**SDS 10%**

- 
- 100 g de Dodecil sulfato de sódio (SDS)
  - 900 ml H<sub>2</sub>O ultra pura
- 

**Obs:** Misturar vigorosamente no agitador magnético à temperatura de 68°C até a dissolução completa. Ajustar o volume a 1000 ml com H<sub>2</sub>O e manter à temperatura ambiente.

---

**Tabela 6.** Soluções necessárias ao processo de Electroforese em gel de agarose

**TAE 50X (Solução Stock)**

- 
- 242 g de Tris Base (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)
  - 57,1 ml de Ácido acético glacial
  - 100 ml de 0,5M EDTA (pH8)
- 

**Obs:** Ajustar o volume final a 1000 ml com H<sub>2</sub>O e manter à temperatura de 4°C.

---

**TAE 1X (Concentração de trabalho na electroforese)**

- 
- 20 ml TAE 50X
  - 980 ml H<sub>2</sub>O ultra pura
- 

**Obs:** Manter à temperatura de 4°C.

---

**Brometo de Etídio 10mg/ml (para Eletroforese)**

- 
- 1 g de Brometo de Etídio
  - 100 ml H<sub>2</sub>O ultra pura
- 

**Obs:** Agitar no Agitador magnético por algumas horas até que o *pellet* se dissolva. Envolver o recipiente com papel de alumínio e manter num local escuro à 4 °C.

---

**Gel Red™ 1:500 (para Eletroforese)**

- 
- 2 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X in DMSO
  - 998 µl H<sub>2</sub>O ultra pura
- 

**Obs:** Agitar no Agitador magnético até completa dissolução. Envolver o recipiente com papel de alumínio e manter num local escuro à 4 °C.

---