



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Análise da variabilidade genética e do contributo parental em gerações sucessivas de choco cultivado, *Sepia officinalis*, Linnaeus 1758.

João Tiago Rodrigues Gomes

Dissertação
para obtenção do **Grau de Mestre em Aquacultura e Pescas**

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutor José Pedro Andrade

Doutor António Sykes

2014



UALg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Análise da variabilidade genética e do contributo parental em gerações sucessivas de choco cultivado, *Sepia officinalis*, Linnaeus 1758.

João Tiago Rodrigues Gomes

Dissertação
para obtenção do **Grau de Mestre em Aquacultura e Pescas**

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutor José Pedro Andrade

Doutor António Sykes

2014

Análise da variabilidade genética e do contributo parental em gerações sucessivas de choco cultivado, *Sepia officinalis*, Linnaeus 1758.

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

João Tiago Rodrigues Gomes

Copyright João Tiago Rodrigues Gomes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Índice

Agradecimentos.....	4
Abstract	5
Resumo.....	6
1. Introdução.....	7
2. Material e métodos	11
2.1. Desenho experimental	11
2.2. Análise genética	12
2.2.1. Extração de ADN	12
2.2.2. Quantificação de ADN	12
2.2.3. Amplificação por reações em cadeia da Polimerase (<i>PCR</i>)	13
2.2.4. Genotipagem	15
2.2.5. Erros de genotipagem, caracterização genética e análise de paternidades	16
3. Resultados	18
3.1. Extração de ADN	18
3.2. Caracterização genética e erros de genotipagem.....	18
3.3. Análise de paternidades.....	23
3.3.1. F1 para F2.....	23
3.3.2. F2 para F3.....	25
4. Discussão.....	29
4.1. Extração de ADN	29
4.2. Consanguinidade em gerações sucessivas.....	31
4.3. Análise parental.....	35
4.4. Erros de genotipagem.....	38
5. Considerações finais.....	40
6. Referências bibliográficas	42

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Doutor José Pedro Andrade e ao Doutor António Sykes pela oportunidade de realizar este trabalho e por toda a orientação dada.

À Céline Madeira por todo o apoio disponibilizado e por tudo aquilo que aprendi graças à sua ajuda.

Agradeço a todos os elementos do laboratório 1.19 do CCMar, especialmente à Ana e à Cátia, por toda a ajuda e apoio que prestaram ao longo do decorrer do trabalho e por todas as conversas que ajudaram a passar melhor o tempo.

À minha companheira de bancada inicial, a Diana, pelo companheirismo presente durante os processos de aprendizagem.

Aos meus avós, Armando e Olívia, aos meus pais, João e Rosa, e à minha irmã, Joana, por todo o apoio em todos os diversos sentidos, sem o qual seria impossível realizar este trabalho.

À Marta, por me aturar e me ajudar sempre e em qualquer momento.

Obrigado por tudo.

Aos dois projetos que financiaram o meu trabalho:

Improving the reproduction of the European cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) in captivity: a multidisciplinary approach (Acrónimo:SepiaBreed), ref^a PTDC/MAR/120876/2010)

Desenvolvimento da tecnologia de produção aquícola do choco, *Sepia officinalis*: rações e afinações zootécnicas (Acrónimo:SepiaTech), ref^a PROMAR 31.03.05. FEP.002

Abstract

The cuttlefish, *Sepia officinalis*, Linnaeus, 1758, is one of the cephalopod species more easily cultivated in laboratory since the late 1960s, because it presents a set of biological characteristics that make it highly suitable for intensive culture on large scale. However, after the production of 6-7 successive generations under controlled conditions, a reproductive breakdown occurs, and inbreeding has been suggested as the potential cause. Thus, in this study it was investigated the genetic variability in three successive generations of cuttlefish, by analysing the microsatellite markers Sof1, Sof2b, Sof3c, Sof4b, Sof5, Sof6 and Sof7b, as a first indicator of the genetic health, followed by analysis of the parental contribution pattern in order to determine the culture characteristics that aimed maintenance of the genetic variability at acceptable levels in successive generations under control conditions.

In the present study, a decrease in genetic variability throughout the generations has been observed by decreasing in the number of alleles and expected heterozygosity. Under the sex-ratio used of 2 males to 1 female, it was found that only half of the males could originate offspring, in a multi-paternity pattern, attributed to competition among males. The causes of decreased genetic variability were given to a possible founder effect at the time of obtaining the 1st generation (wild) and during selection of the individuals for the following generations. The participation of only half of the males to the next generation genetic pool, also contributed to the decrease of genetic variability.

Resumo

O choco, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, é uma das espécies de cefalópodes mais facilmente cultivada em laboratório desde o final da década de 1960 porque apresenta um conjunto de características biológicas que a tornam altamente adequada para a cultura intensiva em larga escala. Contudo, após a produção de algumas gerações sucessivas em condições controladas, verifica-se um colapso na reprodução tendo a consanguinidade sido apontada como potencial causadora. Desta forma, no presente estudo, investigou-se a variabilidade genética em três gerações sucessivas de choco, através da análise dos marcadores moleculares microssatélites Sof1, Sof2b, Sof3c, Sof4b, Sof5, Sof6 e Sof7b, como primeiro indicador da saúde genética, seguido pela análise dos padrões da contribuição parental de forma a determinar as características de cultivo que visam manter a variabilidade genética em níveis aceitáveis, nas gerações produzidas em condições controladas.

Os resultados indicam uma diminuição da variabilidade genética ao longo das três gerações através da redução do número de alelos e da heterozigotia esperada. No rácio sexual presente no sistema de cultivo de aproximadamente 2 machos para 1 fêmea, constatou-se que apenas metade dos machos conseguiram originar descendência com as fêmeas num padrão de multipaternidade, atribuído à elevada competição presente entre os machos. As causas da diminuição da variabilidade genética foram atribuídas ao possível efeito fundador presente no momento da obtenção da 1ª geração (selvagem) e na seleção dos indivíduos para as gerações seguintes, juntamente com a participação de apenas metade dos machos para o conjunto de informação genética dos progenitores.

1. Introdução

O aumento da população humana provocou uma maior procura de produtos pesqueiros, o que determinou a intensificação e a diversificação das capturas. Embora tenha ocorrido uma diminuição no consumo e na produção de peixe nos países desenvolvidos (FAO, 2010), globalmente, o consumo de peixe duplicou desde o início de 1970 (Delgado *et al.*, 2003). Este perfil de crescimento verificou-se em diferentes grupos de recursos pesqueiros, incluindo os cefalópodes. Entre 1950 e 1970, as capturas de cefalópodes aumentaram de 20 milhões de toneladas para 70 milhões de toneladas (Amaratunga, 1983). Atualmente, as espécies de cefalópodes representam, em todo o mundo, uma importante fonte de recursos marinhos utilizados para o consumo humano contribuindo para, aproximadamente, 4% das capturas a nível mundial registado em 2010 (FAO, 2012). Alguns aspetos da biologia e da fisiologia dos cefalópodes, juntamente com o facto de possuírem elevado valor comercial em diversos mercados, principalmente na Ásia e na bacia do Mediterrâneo, torna-os bons candidatos para a sua exploração em aquacultura (Kunisaki, 2000; Ruíz-Capillas *et al.*, 2002). Globalmente, a produção pesqueira encontra-se estável nas 90 milhões de toneladas, tendo atingido o seu potencial máximo. Com o atual aumento da população humana, a produção em aquacultura possui o potencial de realizar uma contribuição significativa de forma a manter o consumo da crescente população, embora que para tal tenha de conseguir atingir as 80 milhões de toneladas em 2050 (FAO, 2012).

O interesse sobre o cultivo dos cefalópodes tem aumentado durante as últimas décadas (Lee *et al.*, 1998), com base na identificação de algumas espécies potenciais para a aquacultura comercial (Boucaud-Camou, 1990; Hanlon *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1998). O choco, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758, é uma espécie necto-bentónica que ocorre predominantemente em fundos arenosos e lodosos desde a linha de costa (2-3 metros de profundidade) até aproximadamente 200 metros de profundidade, com maior abundância nos primeiros 100 metros. A vida em águas costeiras expõe esta espécie a condições hidrológicas variáveis, sendo desta forma *S. officinalis* relativamente tolerante a variações na salinidade (Guerra, 2006). Na sua área de distribuição (Atlântico Este e Mar Mediterrâneo) constitui um importante recurso comercial, compreendendo as capturas mundiais valores entre as 14000 e as 26000 toneladas entre 2008 e 2011 (FAO). O choco é geralmente comercializado fresco ou congelado e é um alimento bastante apreciado em países como o Japão, República da Coreia, Itália e Espanha (FAO). Em Portugal, os indivíduos de menor dimensão são considerados uma iguaria e têm maior valor comercial (Sykes *et al.*, 2006a).

Segundo alguns autores, o choco apresenta um conjunto de características biológicas que o tornam altamente adequado para a cultura intensiva em larga escala, sendo uma das espécies de cefalópodes mais facilmente cultivada em laboratório desde o final da década de 60 do século passado (Richard, 1971; Pascual, 1978; Boletzky e Hanlon, 1983; Forsythe *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998; Domingues *et al.*, 2001a, 2001b). Entre essas características, encontra-se a elevada capacidade de adaptabilidade à vida em cativeiro, a produção de ovos relativamente grandes, a elevada taxa de sobrevivência dos recém-nascidos, o comportamento sedentário, a tolerância a elevadas densidades de cultivo, com reduzida taxa de canibalismo, a aceitação de alimento morto e fácil reprodução em cativeiro durante várias gerações (Forsythe *et al.*, 1994; Sykes *et al.*, 2006a).

Contudo, após a produção de algumas gerações sucessivas em condições controladas, verifica-se um colapso na reprodução de *S. officinalis*, em que apenas algumas fêmeas efetuam posturas e os embriões resultantes não eclodem, sendo necessária a obtenção de novos reprodutores selvagens. Esta problemática foi inicialmente reportada por Forsythe *et al.* (1994), que comprovaram o colapso da reprodução ao fim de sete gerações produzidas em condições controladas. Este colapso traduziu-se na incapacidade da realização de todo o comportamento associado à reprodução, quer pelos machos, quer pelas fêmeas. Estes autores referem, igualmente, que a taxa de fertilidade sofreu uma tendência negativa ao longo das gerações sucessivas. Todavia, consideram que a possível causa da falha da 7ª geração se deve a um problema de natureza zootécnica, atribuindo pouco valor à consanguinidade como possível causa do colapso na reprodução. Mais recentemente, Sykes *et al.* (2006b) observaram, ao fim de seis gerações sucessivas em condições controladas a obtenção de ovos não viáveis, comprovando os resultados obtidos por Forsythe *et al.* (1994). Sykes *et al.* (2006b) consideram a consanguinidade como causa determinante para a produção de ovos não viáveis, embora a composição da dieta possa também ter influência na percentagem de ovos não viáveis e nos valores de mortalidade superiores observados na geração terminal.

A consanguinidade é geralmente reconhecida pelos efeitos negativos que provoca no desempenho reprodutivo, e atua primeiramente no aumento de homozigóticos nas populações através da diminuição de diversidade genética (Eldik *et al.*, 2006). Este aumento de homozigóticos muitas vezes origina reduzida viabilidade e fecundidade (“*inbreeding depression*”) (Ralls e Ballou, 1983). Este efeito está descrito em inúmeras espécies, nomeadamente, no peixe-zebra (*Danio rerio*) (Mrakovcic e Haley, 1979), na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) (Gjerde *et al.*, 1983), e no guppy (*Poecilia reticulata*) (Nakadate *et al.*, 2003). Adicionalmente, a perda de diversidade genética acarreta outras consequências

deletérias, nomeadamente na resistência a doenças, no crescimento, na sobrevivência, e no risco de extinção (Gjerde *et al.*, 1983; Reed *et al.*, 2002; Spielman *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de marcadores moleculares baseados no ADN provocou um impacto revolucionário nos estudos de genética, o que permitiu o rápido progresso em diversas áreas científicas, incluindo a aquacultura. Da elevada diversidade de marcadores moleculares são constituintes: aloenzimas, ADN mitocondrial, *RFLP*, *RAPD*, *AFLP*, *SNP*, *EST* e microssatélites. (Liu e Cordes, 2004).

Os microssatélites consistem em várias cópias de sequências simples repetidas (*SSRs*) dispostas em *tandem* que variam em dimensão entre 1 a 6 pares de bases (Tautz, 1989). Os microssatélites constituem uma ferramenta robusta de análise da variabilidade genética e da contribuição parental, uma vez que estes são marcadores codominantes, hipervariáveis e *uni-locus* facilmente analisáveis (Awise, 2004; Pemberton, 2009). Adicionalmente, são herdados de forma Mendeliana, ocorrem de forma uniforme e abundante no genoma, são *loci* de tamanho reduzido e com elevado polimorfismo (Liu e Cordes, 2004). A sua natureza altamente variável torna estes marcadores particularmente adequados para estudos de relações de parentesco e de análise de paternidade (O'Connell e Wright, 1997).

Para determinar se uma população é saudável geneticamente, torna-se necessário averiguar a sua variabilidade genética (Frankham *et al.*, 2004). Para o choco esta encontra-se documentada em diversas populações selvagens. Segundo Pérez-Losada *et al.* (2002), para amostras com origem no Atlântico Nordeste e na costa Mediterrânea da Península Ibérica, os autores relataram encontrar-se perante elevada variabilidade genética, recorrendo ao uso de sete microssatélites descritos por Shaw e Pérez-Losada (2000). Nesse mesmo estudo também foi detetada elevada estruturação subpopulacional. Wolfram *et al.* (2006), através da utilização dos mesmos sete microssatélites, averiguou a variabilidade genética entre populações do Golfo da Biscaia, Canal da Mancha, Mar do Norte, e sul de Portugal (Faro). Com exceção da última, todas as populações mostraram diminuta diferenciação genética. No âmbito do cultivo do choco, não existe atualmente nenhum trabalho que tenha incidido sobre o estado genético das populações cativas, daí a importância do presente trabalho.

Nos estudos de contribuição parental é necessário compreender se esta se realiza de um modo aleatório ou se existe a tendência de apenas um determinado conjunto de machos contribuírem para a descendência (Chesser e Baker, 1996). Avanços recentes na análise genética demonstraram que a paternidade múltipla é frequente em invertebrados e em vertebrados (Ireland *et al.*, 2003), e que a frequência é importante em situações relacionadas com a aptidão dos machos e das fêmeas em estratégias de acasalamento alternativas (Zane *et*

al., 1999). Para *S. officinalis* existem estudos como o de Boal (1997) que aborda a escolha de machos por parte das fêmeas, e o de Hanlon *et al.* (1999) que incide sobre a importância da competição espermática nesta espécie. Segundo Chesser e Baker (1996) a frequência de paternidade múltipla é também potencialmente importante e com impacto na heterozigotia das diferentes gerações. A bibliografia sobre a utilização de microssatélites para a aferição da paternidade é abundante para diferentes espécies de peixes como *Gambusia holbrooki* (Zane *et al.*, 1999), *Solea senegalensis* (Porta *et al.*, 2006), *Sparus aurata* (Castro *et al.*, 2007), *Raja clavata* (Chevolot *et al.*, 2007), e outros vertebrados como a tartaruga verde *Chelonia mydas* (Ireland *et al.*, 2003) e o pato-real *Anas platyrhynchos* (Denk *et al.*, 2004).

Tendo em conta a importância da variabilidade genética, tanto para mais em populações com diminuto número de indivíduos, como são geralmente as populações produzidas em cativeiro, foi desenvolvido este estudo com o objetivo de perceber se ocorre um processo de diminuição de variabilidade genética nas gerações sucessivas de choco, que ponha em causa a saúde genética dos mananciais cultivados e a sua viabilidade. Com a análise da contribuição parental, deverá ser possível observar o processo de transferência de informação genética nas gerações cultivadas e, por conseguinte, verificar os efeitos da mesma sob a variabilidade genética. Assim, pretende-se, utilizando os microssatélites como marcadores moleculares, conhecer a variabilidade genética em gerações sucessivas de choco produzidas em condições controladas e determinar a contribuição parental em cada uma dessas gerações.

Desta forma, os resultados deste trabalho podem contribuir para o desenvolvimento de um programa de seleção adequado e que vise manter a variabilidade genética em níveis aceitáveis nas gerações de choco produzidas em condições controladas.

2. Material e métodos

2.1. Desenho experimental

A informação utilizada no presente trabalho resultou da produção de três gerações sucessivas de *S. officinalis*, em condições controladas. O cultivo destes indivíduos foi efetuado no âmbito dos projetos em curso no grupo de investigação em Biologia Pesqueira e Hidroecologia do Centro de Ciências do Mar. O sistema de cultivo utilizado encontra-se descrito por Sykes *et al.* (2006b), consistindo num sistema aberto com fluxo de água de 12 Lh⁻¹, que assegurava excelente qualidade de água do ponto de vista físico, químico e bacteriológico.

A primeira geração analisada neste estudo (F1) teve origem num conjunto de ovos recolhido na Ria Formosa, tendo esta sido cultivada desde Julho de 2010 até Janeiro de 2011. A segunda geração (F2), obtida a partir do cruzamento entre indivíduos da F1, foi produzida a partir de Setembro de 2010 até inícios de Junho de 2011, com as posturas de F1. A última geração considerada neste estudo (F3), resultante do cruzamento entre indivíduos da F2, foi obtida a partir de Maio de 2011 e cultivada até Março de 2012. O número de indivíduos utilizados em cada geração F1, F2 e F3, encontram-se na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 – Número de indivíduos das gerações F1, F2 e F3 em função dos sexos e com os respetivos rácios sexuais (nº total de machos/ nº total de fêmeas = proporção de machos para 1 fêmea).

	Machos	Fêmeas	Rácio Sexual (M:F)	Indeterminados	Total
F1	42	25	1,68:1	6	73
F2	46	22	2,1:1	3	71
F3	12	14	0,85:1	25	51

Para a recolha de amostras foram realizadas amostragens periódicas após as posturas. Contudo, as amostras de alguns indivíduos foram recolhidas fora destes períodos, aquando da sua morte, antes e durante o período de reprodução. Adicionalmente, alguns indivíduos não puderam, de todo, ser amostrados, devido à morte ter ocorrido durante o período noturno o que tornava a recolha inviável no dia seguinte, pois nenhum material biológico restava, à exceção da siba. As amostras consistiam num fragmento (com cerca de 2,5x2,5 cm) recolhido da musculatura do manto ou dos tentáculos, sendo armazenadas em *falcons* de 15mL, com etanol a 80%, e mantidos a cerca de -20°C.

2.2. Análise genética

2.2.1. Extração de ADN

Para a extracção do ADN foi utilizado o método de precipitação salina, adaptado do protocolo descrito por Miller *et al.* (1988). Para tal, adicionaram-se 300 µL de solução tampão lise 1 (0,1 M de Tris-HCl a pH 8,0; 0,1 M de EDTA a pH 8,0) num microtubo com tampa de rosca de 1,5 mL. De seguida, juntaram-se, aproximadamente, 10 mg de tecido triturado seguido de 300 µL de solução tampão lise 2 (0,1 M de Tris-HCl a pH 8,0; 0,1 M de EDTA a pH 8,0; 1% SDS). Cada tubo foi colocado no vortex durante 1 minuto, adicionando-se 32 µL de solução de precipitação (NaCl a 6 M) e 40 µL de proteinase k (20 mg/mL). Posteriormente, os tubos foram colocados a 55°C, sob agitação contínua, durante pelo menos 12 horas, de modo a assegurar a digestão completa das proteínas. Após o período de digestão, e tendo o tubo atingido a temperatura ambiente, adicionaram-se 30 µL de RNase (10 mg/mL), colocando em seguida a incubar a 37°C, durante uma hora. Após o período de incubação, juntaram-se 160 µL de solução de precipitação (NaCl a 6 M) e colocaram-se a -20°C durante 20 minutos, de forma a melhorar a precipitação das proteínas. Centrifugaram-se durante 3 minutos a 13000 rpm, por duas vezes. Caso não ocorresse formação de depósito ou se o sobrenadante mantivesse alguma turbidez, voltava-se a centrifugar até 20 minutos, a 13000-14000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e colocado num novo microtubo. Seguidamente, adicionaram-se 160 µL de isopropanol, invertia-se o tubo cerca de 25 vezes e executava-se uma centrifugação de 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi retirado e descartado, colocando-se o microtubo com o sedimento a secar a 37°C e eluía-se em aproximadamente 30 µL de água bidestilada (Mili Q) autoclavada. De seguida mantinham-se a 4°C durante 24 horas para posterior utilização.

2.2.2. Quantificação de ADN

De forma a verificar a qualidade e a integridade do ADN extraído, este foi analisado através da técnica de eletroforese em gel de agarose, a 0,8%, contendo 1 µL de uma solução comercial GelRed™ a 10000x, que permitia a visualização das bandas do gel, quando submetido a luz ultravioleta (Sambrook e Russell, 2001).

Adicionalmente, a amostra de ADN foi submetida a um processo de espectrofotometria, com o objetivo de determinar a quantidade de ADN e de contaminantes após o processo de extração. Para tal foi utilizado o espectrofotómetro ScanDrop® (Analytik Jena) que quantificou o ADN de cadeia dupla de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

sendo **C** a concentração de ADN em ng/μL, **Abs** a absorvância (neste caso correspondendo a 260nm, ou seja, ao pico de absorção de luz ultravioletas do ADN), **e** o coeficiente de extinção (que para o ADN de cadeia dupla é de 50 ng.cm/μL) e **b** a altura da coluna criada pelo espectrofotómetro.

Para determinar a pureza do ADN, o espectrofotómetro realizou também uma medição das absorvâncias a 280 nm, que corresponde ao valor máximo de absorção de luz ultravioleta de proteínas, e a 230 nm, que corresponde ao valor máximo de absorção de luz ultravioleta de contaminantes orgânicos (Glasel, 1995; Held, 2001).

2.2.3. Amplificação por reações em cadeia da Polimerase (*PCR*)

Inicialmente, este trabalho foi planeado de forma a ser realizado um único *PCR* para a amplificação simultânea dos 7 *loci* pretendidos e descritos por Shaw e Pérez-Losada (2000). Após análise dos oligonucleótidos (doravante designados oligos) no programa AutoDimer v1 (Vallone e Butler, 2004) para avaliar as suas interações, foi necessário redesenhar os oligos Sof2, Sof3, Sof4 e Sof7, de forma a ser possível a realização de um *PCR multiplex* (**Tabela 2.2**).

Desta forma, o *PCR multiplex* foi otimizado para todos os parâmetros necessários e revelou-se funcional. Infelizmente, devido a uma contaminação da taq-polimerase utilizada, foi necessário adquirir nova enzima, sendo esta diferente da anterior, o que inviabilizou o protocolo de *PCR multiplex* otimizado anteriormente. Todavia, devido ao tempo e investimento necessários para otimizar de novo este procedimento foi adotada uma estratégia alternativa, que consistiu na otimização de um *PCR multiplex* com quatro oligos (Sof1, Sof2b, Sof5, Sof7b) e três *PCR's simplex* para cada um dos oligos restantes (Sof3c, Sof4b, Sof6). Os oligos referidos anteriormente que foram modificados sofreram alterações na extremidade 5' ou nas extremidades 5' e 3' (**Tabela 2.2**). Para que os produtos de *PCR* fossem devidamente detetados pelo sequenciador automático, foi necessário marcar um dos oligos por *locus* com diferentes fluorocromos, tendo sido optado por marcar todos os oligos *Reverse*.

Cada reação de *PCR* foi realizada utilizando um volume final de 10 μL. Para a reação de *PCR multiplex* utilizaram-se 2 μL de tampão de reação (1x), 1 μL de dNTP's a 2mM, 1 μL de MgCl₂ a 25mM, 0,2 e 0,4 μL a 10μM dos oligos *Reverse e Forward*, respetivamente, 0,2

Tabela 2.2 – Características do 7 loci polimórficos de *S.officinalis* utilizados neste estudo (adaptado de Shaw e Pérez-Losada, 2000). *Locus*, Oligo em que For: *forward* e Rev: *reverse*, motivo de repetição, número de alelos, temperatura de hibridação, quantidade de oligo (µL).

<i>Locus</i>	Oligo (5'-3')	Motivo	Número de alelos	Temperatura de hibridação	Quantidade de Oligo (µL)
Sof1	For: CGCGGTTTGTCTACACCAG Rev:Vic AATCATTTTCAGTATGTCGGAAG	(ATT)17	16	60°C	0,4 0,2
Sof2b	For: AGTTATATCAGTTTTCCAAAGC* Rev:Vic ACGACATTAACAGTTTTTCAGC**	(AAT)16	11	60°C	0,4 0,2
Sof3c	For: AGTTATATCAGTTTTCCAAAGC** Rev:Pet AGTCTATTGGAGTCTTTACC*	(AAT)15	23(16)	58°C	0,4 0,2
Sof4b	For: GTTTATAACTCTGAGATGAGG** Rev:Fam ACTATGTCATCTTCGTTG**	(ATT)10...5...4	14	62°C	0,4 0,2
Sof5	For: TCTTGTTTCGACTGGGTATG Rev:Ned CGGGCAATATGTGAACCTATC	(TTA)11TCA (TTA)11TCA(TTA)6	18	60°C	0,4 0,2
Sof6	For: GGATTGTTGAGGTTTTTCGTG Rev:Fam CAACTAGCCCAGAACGATTG	(ATT)17	14	60°C	0,4 0,2
Sof7b	For: CACGACAAGCTAGATATGG Rev:Fam AGCGATTCAGAGTAATGAGC	(ATT)8	5	60°C	0,4 0,2

* Oligos modificados de Shaw e Pérez-Losada (2000), na extremidade 5'.

** Oligos modificados de Shaw e Pérez-Losada (2000), nas extremidades 5' e 3'.

μL de soro de albumina bovina, $0,2 \mu\text{L}$ da enzima *Taq* a $5\text{u}/\mu\text{L}$ (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega), $1 \mu\text{L}$ de ADN extraído a $30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $2,2 \mu\text{L}$ H_2O bidestilada (Mili Q) autoclavada. Para cada reação de *PCR simplex* utilizaram-se $2 \mu\text{L}$ de tampão de reação (1x), $1 \mu\text{L}$ de dNTP's a 2mM , $0,8 \mu\text{L}$ de MgCl_2 a 25mM , $0,2$ e $0,4 \mu\text{L}$ a $10\mu\text{M}$ dos *primers Reverse e Forward*, respectivamente, $0,2 \mu\text{L}$ de soro de albumina bovina, $0,2 \mu\text{L}$ da enzima *Taq* a $5\text{u}/\mu\text{L}$ (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega), $1 \mu\text{L}$ de ADN extraído a $30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $4,2 \mu\text{L}$ H_2O bidestilada (Mili Q) autoclavada.

Os programas de reação de *PCR multiplex* e *simplex* otimizados iniciaram-se por uma primeira fase de desnaturação do ADN por aquecimento da amostra a 94°C durante 5 minutos. Seguiu-se uma fase de três etapas cíclicas (35 ciclos) compostas por desnaturação a 94°C durante 30 segundos, temperatura específica de hibridação dos oligos durante 30 segundos, síntese de nova cadeia a uma temperatura de 72°C durante 45 segundos. Após a realização dos 35 ciclos ocorreu uma etapa final de extensão a 72°C durante 10 minutos (**Figura 2.1**). Estes foram realizados num termociclador Prime Elite (Tecne®).

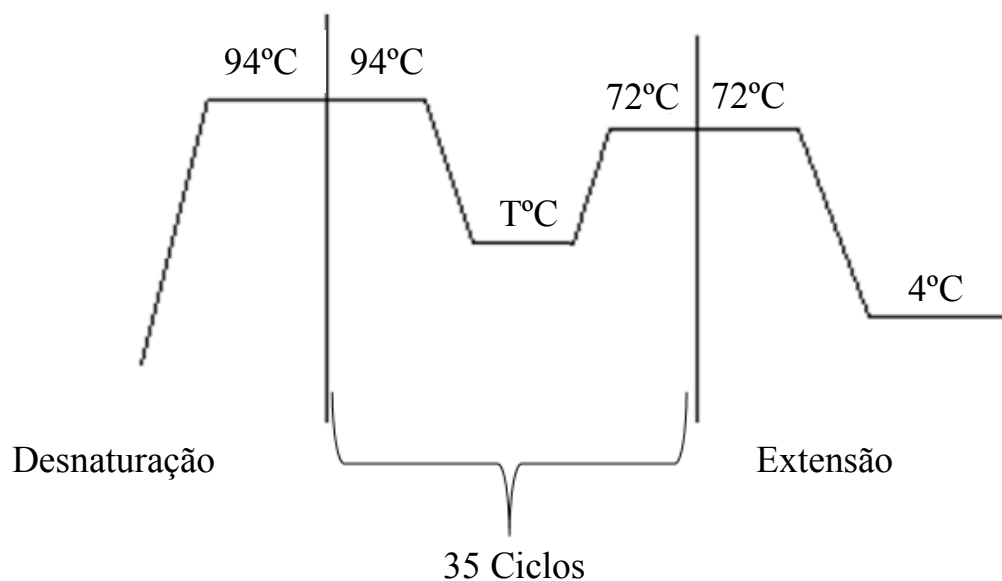


Figura 2.1 – Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (*PCR*) usada, em que $T^\circ\text{C}$ corresponde à temperatura específica de hibridação otimizada dos oligos.

2.2.4. Genotipagem

Para a determinação do tamanho dos alelos, adicionou-se, a $1 \mu\text{L}$ de cada produto de *PCR*, $8 \mu\text{L}$ de solução de migração da amostra, composta por $7,7 \mu\text{L}$ de Hi-Di Formamida e $0,3 \mu\text{L}$ de marcador molecular GeneScan™ 500Liz®. Seguidamente as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos e mantidas a 4°C durante 10 minutos, efetuando-se,

em seguida, eletroforese em sequenciador automático Genetic Analyzer 3130XL de 16 capilares (Applied BioSystems, E.U.A).

Os ficheiros com os resultados da genotipagem foram analisados com o auxílio do programa STRand 2.4.59 (Veterinary Genetics Lab), que permitiu visualizar e seleccionar corretamente os alelos amplificados e genotipados. Para a efetiva aferição do número de alelos, suas posições e posterior exportação dos dados, foi utilizado o pacote MsatAllele 1.03 (Alberto, 2009) implementado através do programa de computação estatística e gráfica R 3.0.0.

2.2.5. Erros de genotipagem, caracterização genética e análise de paternidades

Os erros de genotipagem ocorrem quando o genótipo determinado após análise molecular não corresponde ao genótipo real do indivíduo em causa. Hipoteticamente, qualquer conjunto de dados genéticos contém erros de genotipagem, que podem alterar consideravelmente os resultados, principalmente em estudos baseados na identificação individual. Estes podem ter origem em qualquer fase do processo de genotipagem (amostragem, extração de ADN, análise molecular, análise dos dados), com diversas causas (humanas, artefactos técnicos) (Bonin *et al.*, 2004). Quando são utilizados microssatélites, os erros de genotipagem podem surgir devido à diminuta quantidade e/ou qualidade do ADN, característica típica de estudos que recolhem amostras de tecido de forma não-invasiva, tornando a reação em cadeia da polimerase pouco confiável. Como consequência, um problema comum é a incapacidade estocástica de amplificar um alelo, dando origem a que heterozigotas, aparentemente, só possuam um alelo, designados por alelos nulos (Taberlet *et al.*, 1996).

Os erros de genotipagem representam uma importante causa na diminuição da potência dos testes de atribuição parental (Vandeputte *et al.*, 2006), uma vez que a aquisição de genótipos errados contribui para distorcer a identificação individual (Paetkau, 2003), tal como a posterior análise parental (Miller *et al.*, 2002). De forma a assegurar a diminuição deste efeito, foi estimada a probabilidade de erro de genotipagem, pela repetição da amplificação pela reação de *PCR* de 10 amostras para todos os *loci*, separadamente por 6 vezes. Para tal, foi utilizado o programa GIMLET 1.3.3 (Valière, 2002) com o objetivo de estimar o tipo e a probabilidade dos diferentes erros de genotipagem e construir um genótipo consenso. Este genótipo consenso foi elaborado através do método de *Threshold* (valor 2), em que um alelo é aceite quando este figure, pelo menos, duas vezes nos replicados e se

ocorrerem mais que dois alelos diferentes mantidos, o genótipo é considerado ausente dos dados (Valière, 2002).

Para a caracterização genética, foi utilizado o programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) tendo sido calculadas as frequências alélicas, a heterozigotia observada (H_o), a heterozigotia esperada (H_e) e o coeficiente de endogamia (F_{is}) por *locus*, calculado segundo Weir e Cockerham (1984). Com o programa CERVUS 3.0.3 (Kalinowski *et al.*, 2007), calcularam-se o conteúdo de informação polimórfica (PIC), baseada nas frequências alélicas observadas (Botstein *et al.*, 1980; Hearne *et al.*, 1992), avaliou-se a existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg, através do teste do chi-quadrado (χ^2), com a correção de Yates e respectiva significância com a correção de Bonferroni (Nei, 1987), e a determinação dos progenitores mais prováveis para cada indivíduo da descendência.

Para a atribuição de paternidades, recorreu-se à utilização do método de exclusão, no qual o genótipo dos progenitores é comparado com o da descendência, sendo excluídos os indivíduos que não apresentam semelhanças. Todavia, nem sempre é possível determinar apenas um par de progenitores, uma vez que inúmeros candidatos podem não ser excluídos. O programa utilizado calcula a probabilidade do rácio de verosimilhança (*likelihood* ou LOD *ratio*), permitindo distinguir estatisticamente os candidatos não excluídos, calculando a razão entre a probabilidade do par candidato ser o verdadeiro e a probabilidade desse par não ser o verdadeiro. A obtenção de um LOD positivo indica que a probabilidade do par candidato ser o verdadeiro é maior que a de um par candidato escolhido ao acaso. Porém, um LOD negativo significa que a probabilidade do par em causa ser o verdadeiro candidato é menor que a de um par escolhido ao acaso, sendo a confiança estatística deste teste determinada pelo valor de delta (diferença entre LOD do par com maior probabilidade e o LOD do segundo par mais provável) (Kalinowski *et al.*, 2007).

Nas duas simulações da análise de paternidade realizadas, foram consideradas as frequências alélicas de todos os possíveis progenitores amostrados (F1: 25 fêmeas e 42 machos; F2: 22 fêmeas e 46 machos), considerando uma amostragem de 100% e 10000 descendentes. A proporção de erro utilizado foi de 0,088, calculado a partir da média das taxas de erro obtidas com o programa GIMLET, e considerando que cada amostra continha no mínimo 4 dos 7 *loci* genotipados. A escolha destes critérios foi realizada em função das considerações feitas por Marshall *et al.* (1998).

3. Resultados

3.1. Extração de ADN

Como é possível verificar na **Figura 3.1**, o processo de extração de ADN não exibiu uma taxa de eficiência estável. Algumas amostras apresentaram uma banda bem marcada, definida e forte (F, L, M, N,O), enquanto outras possuíam uma banda mal definida e muito ténue (B, C, D, E, I, J, K). Também é possível observar a presença de amostras que demonstraram um perfil de degradação do ADN (A, H). Por análise dos valores de concentração de ADN por espectrofotometria, o valor médio de ADN extraído por amostra correspondeu a 60 ng/μL, variando, aproximadamente entre 10 ng/μL e 500 ng/μL.

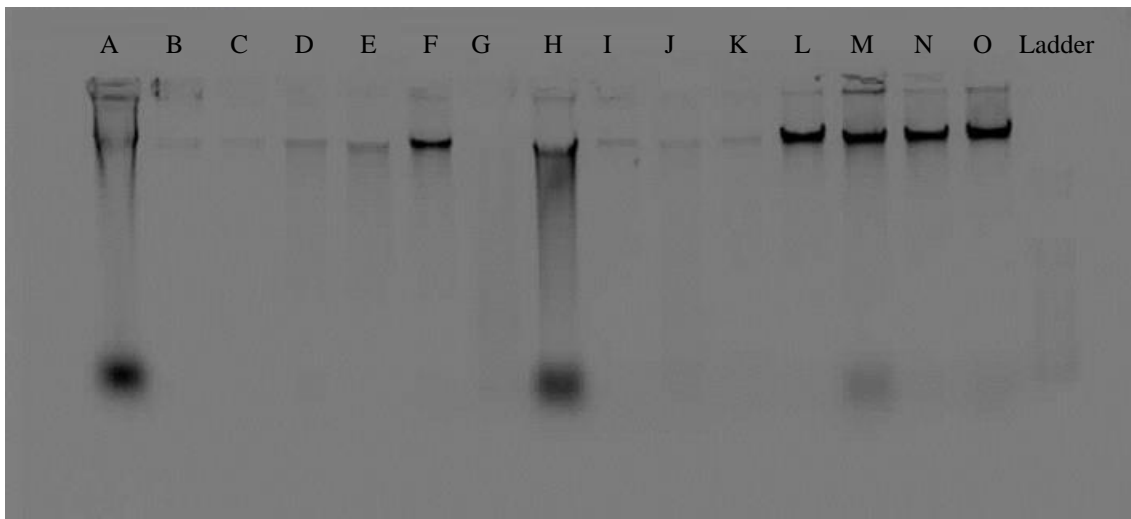


Figura 3.1 – Separação por eletroforese em gel de agarose de ADN genómico do choco. No poço do lado direito foi colocado o marcador molecular (Ladder) de 50bp.

3.2. Caracterização genética e erros de genotipagem

Desde a geração F1 até à geração F3, as frequências alélicas sofreram alterações visíveis (**Figura 3.2**), apresentando o número de alelos em grande parte dos *loci* analisados uma tendência decrescente. Os *loci* Sof2b, Sof3c, Sof6 e Sof7b apresentaram uma diminuição do número de alelos ao longo das três gerações: de 9 para 7, de 9 para 8, de 14 para 7, e de 8 para 5, respetivamente (**Figura 3.2**, **Figura 3.3**). Todavia, foi possível verificar na **Figura 3.2**, a presença de alguns alelos para estes *loci* nas gerações seguintes, mas que não se encontraram representadas na F1, nomeadamente, o alelo 160 no *locus* Sof2b, os alelos 176 e 185 no *locus* Sof3c, e o alelo 225 no *locus* Sof6.

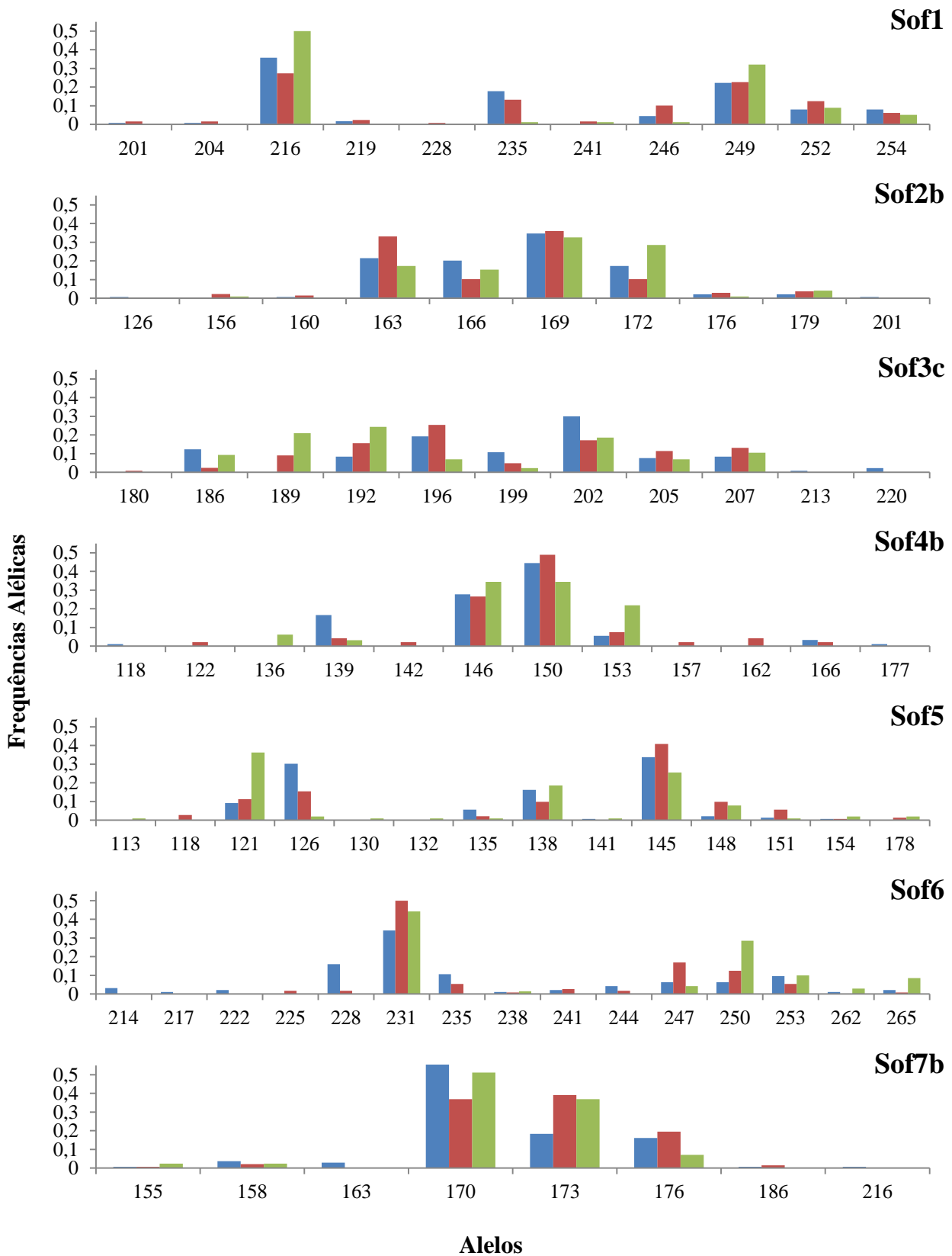


Figura 3.2 – Frequências alélicas de cada *loci* nas três gerações analisadas. F1: ■, F2: ■, F3: ■.

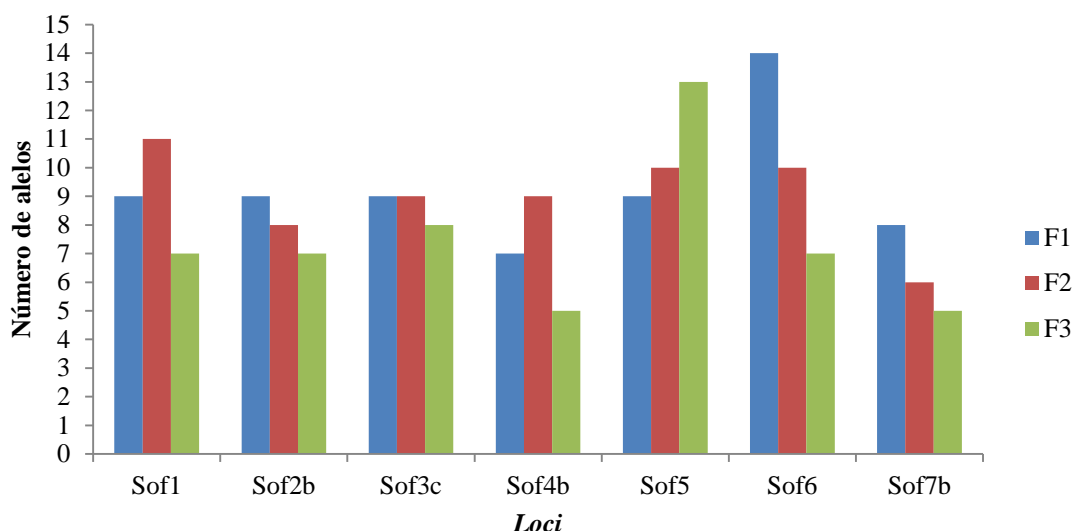


Figura 3.3 – Representação do número de alelos por *locus* por geração. Total de alelos: F1=66; F2=63; F3=52.

Os *loci* Sof1 e Sof4b manifestaram essa mesma diminuição do número, se observarmos apenas estes valores entre a F1 e F3. Contudo, na geração F2, surgiram alelos que se encontravam ausentes da análise da geração anterior (F1). Para o *locus* Sof1 verificou-se a ausência dos alelos 228 e 241, e para o *locus* Sof4, a ausência dos alelos 120,140,155,e 160 (**Figura 3.2**).

O número de alelos no *locus* Sof5 aumentou da geração F1 até à geração F3. Na 1ª geração (F1) encontrou-se ausentes os alelos 113, 118, 130, 132 e 178; na F2 os alelos 113, 130, 132, e 141. Na geração F3 apenas se encontrou ausente o alelo 118 (**Figura 3.2**).

Por estimativa dos erros de genotipagem, evidencia-se a presença de alelos nulos em proporções relativamente elevadas (8 a 13%) nos *loci* Sof1, Sof5 e Sof7b. Quanto aos alelos falsos, a estimativa não permitiu revelar a sua presença (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1 – Análise dos erros detetados para cada um dos sete *loci* utilizados; HF = Homozigóticos falsos ou alelos nulos; FA = Falsos Alelos.

<i>Locus</i>	HF	FA
Sof1	0,083	0
Sof2b	0	0
Sof3c	0	0
Sof4b	0	0
Sof5	0,094	0
Sof6	0	0
Sof7b	0,133	0

As gerações F1, F2 e F3 apresentaram um total de 66, 63 e 52 alelos, respectivamente (**Figura 3.3**). A diversidade de alelos por geração diminuiu da geração F1 até à geração F3 (**Tabela 3.2**) com 9,3 alelos por *locus* na F1 até 7,4 alelos por *locus* na F3. Ao analisar os valores médios de H_o e H_e , por geração (**Tabela 3.2**), verifica-se que esta diminuiu, desde 0,7507 (F1) até 0,7134 (F3). Contudo, ao analisar os valores de H_o , verificou-se que estes se encontram numericamente afastados de H_e , e apresentaram uma distância mais marcada entre si, aumentando de geração para geração (0,4346 na F1 até 0,614 na F3).

Tabela 3.2 – Valores médios, por geração, do número de alelos por *locus* (A), da heterozigotia esperada (H_e), da heterozigotia observada (H_o), e do conteúdo de informação polimórfica (PIC).

	A	H_e	H_o	PIC
F1	9,286	0,751	0,435	0,717
F2	9,000	0,746	0,520	0,712
F3	7,429	0,713	0,614	0,667

Na geração F1, os valores de heterozigotia observados (H_o) variaram entre 0,333 e 0,617, e os de heterozigotia esperados (H_e) entre 0,617 e 0,8255 (**Tabela 3.3**). A geração seguinte (F2), apresentou valores de H_o entre 0,339 e 0,75, e 0,6713 e 0,84, H_e (**Tabela 3.3**). Por último, a geração F3, apresentou valores de H_o entre 0,375 e 0,8431, e de H_e entre 0,5955 e 0,8321 (**Tabela 3.3**).

Os valores calculados para o coeficiente de endogamia (Fis) estão indicados na **Tabela 3.3**. Para os *loci* Sof1, Sof2b, Sof3c e Sof5 verificou-se a diminuição desde a geração F1, passando pela geração F2, até à geração F3, com valores entre 0,557 e 0,263; 0,521 e 0,099; e 0,497 e -0,098, respetivamente. Este parâmetro, por sua vez, aumentou no caso do *locus* Sof4b da 1ª até à 3ª geração. Para os *loci* Sof6 e Sof7b, os valores de Fis aumentaram da F1 para a F2 e diminuíram da F2 para a F3 (**Tabela 3.3**).

Para todos os *loci*, os valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC) situaram-se entre 0,575 e 0,809 (F1), 0,607 e 0,821 (F2), e 0,519 e 0,8111 (F3) (**Tabela 3.3**), com valores médios por geração de 0,717, 0,712, e 0,667, respetivamente (**Tabela 3.2**).

A realização do teste do chi-quadrado na geração F1 mostrou-se significativo para os *loci* Sof1, Sof2b, Sof5, Sof6, e Sof7b, rejeitando assim a hipótese destes encontrarem-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na geração F2, o mesmo teste detetou diferenças significativas para os *loci* Sof2b, Sof6, e Sof7b. Não foram detetadas diferenças significativas para os *loci* Sof4b e Sof5. Apesar de o valor de p para o *locus* Sof5 ($p=0,016$) ter sido inferior ao maior α considerado ($\alpha=0,05$), e desta forma significativo, após a correção de Bonferroni

as diferenças não foram significativas. Nesta mesma geração F2, o programa utilizado não efetuou o teste do chi-quadrado para os *loci* Sof1 e Sof3c por considerar os dados insuficientes. Para a última geração, o programa também não realizou a estatística de teste para os *loci* Sof3c e pela mesma razão referida anteriormente. O *locus* Sof6 mostrou-se significativo antes da correção de Bonferroni, mas após a mesma, juntamente com os *loci* Sof1 Sof2b, Sof5, Sof7b, as diferenças não foram significativas.

Tabela 3.3 – Representação do número de alelos (K), heterozigotia observada (Ho), heterozigotia esperada (He), coeficiente de endogamia (Fis), conteúdo de informação polimórfica (PIC), teste do chi-quadrado (χ^2), valor de p (Valor-p), e significância para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), para cada geração e *loci*. *= significativo para α de 0,05; **= significativo para α de 0,01; ***= significativo para α de 0,001; NS= não significativo, NR= não realizado por dados insuficientes.

	K	Ho	He	Fis	PIC	χ^2	Valor-p	HW
F1								
Sof1	9	0,464	0,775	0,409	0,745	31,242	0,000	***
Sof2b	9	0,333	0,761	0,567	0,724	22,192	0,000	***
Sof3c	9	0,492	0,825	0,410	0,805	2,875	0,090	NS
Sof4b	7	0,444	0,693	0,368	0,645	1,265	0,261	NS
Sof5	9	0,338	0,756	0,557	0,718	50,630	0,000	***
Sof6	14	0,617	0,826	0,263	0,809	11,819	0,001	**
Sof7b	8	0,353	0,617	0,434	0,575	19,531	0,000	***
F2								
Sof1	11	0,75	0,825	0,099	0,803	NR	NR	NR
Sof2b	8	0,529	0,737	0,288	0,696	12,548	0,006	*
Sof3c	9	0,672	0,840	0,208	0,821	NR	NR	NR
Sof4b	9	0,426	0,679	0,382	0,638	2,126	0,145	NS
Sof5	10	0,549	0,772	0,295	0,749	5,794	0,016	NS
Sof6	10	0,339	0,698	0,521	0,67	17,167	0,000	***
Sof7b	6	0,377	0,671	0,445	0,607	17,093	0,000	***
F3								
Sof1	7	0,590	0,636	0,086	0,577	0,417	0,519	NS
Sof2b	7	0,714	0,756	0,066	0,716	0,228	0,633	NS
Sof3c	8	0,814	0,832	0,034	0,811	NR	NR	NR
Sof4b	5	0,375	0,711	0,497	0,658	NR	NR	NR
Sof5	13	0,843	0,761	-0,098	0,726	0,543	0,461	NS
Sof6	7	0,486	0,702	0,321	0,659	3,910	0,048	NS
Sof7b	5	0,476	0,596	0,212	0,519	1,166	0,280	NS

3.3. Análise de paternidades

3.3.1. F1 para F2

Na simulação de paternidade, o programa previu a atribuição de paternidade a 33% da descendência com 95% de confiança, e a 64% da descendência com 80% de confiança. Todavia, os valores efetivos de atribuição de paternidades não corresponderam aos verificados através da simulação, com a atribuição de paternidade a 3% da descendência com 95% de confiança e a 25% com 80% de confiança (**Tabela 3.4**).

Tabela 3.4 – Representação da atribuição de paternidade (F1 para F2) esperada e observada em função de diferentes níveis de confiança

Nível	Confiança (%)	Delta Crítico	Atribuições		Taxa de Atribuições	
			Observado	Esperado	Observado	Esperado
<i>Strict</i>	95	2,66	2	23	3%	33%
<i>Relaxed</i>	80	0,99	17	44	25%	64%
<i>Unassigned</i>			52	25	75%	36%
Total			69	69	100%	100%

A análise da contribuição de cada progenitor do sexo feminino de forma isolada demonstrou que das 25 fêmeas da geração F1, 23 (92%) contribuíram para a geração F2, ocorrendo apenas 2 (8%) fêmeas que não contribuíram para a geração seguinte (**Figura 3.4 A**). Por sua vez, a contribuição de cada progenitor do sexo masculino isoladamente demonstrou que dos 42 machos da 1ª geração, 27 (64%) contribuíram para a geração seguinte e 15 (36%) não deixaram descendência (**Figura 3.4 B**).

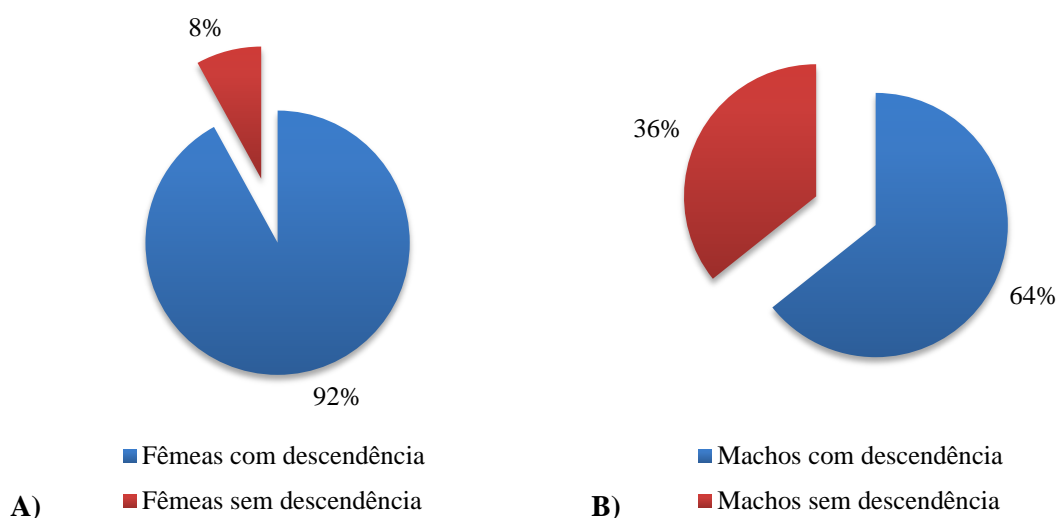


Figura 3.4 – Contribuição das fêmeas e dos machos F1 para a geração seguinte (F2).

A observação do **Figura 3.5**, com a contribuição em porcentagem de todas as fêmeas da F1, permitiu verificar a ocorrência de uma fêmea que contribuiu relativamente mais que as restantes. A fêmea 4 contribuiu 15,7% para a descendência da F1. É possível constatar a presença de outras fêmeas que contribuíram bastante menos, em comparação com a referida anteriormente. Seis fêmeas contribuíram para a descendência, cada uma, com 1,4%; sete com 2,9%; duas com 4,3%; quatro com 5,7%; uma com 7,1% e duas com 8,6%.

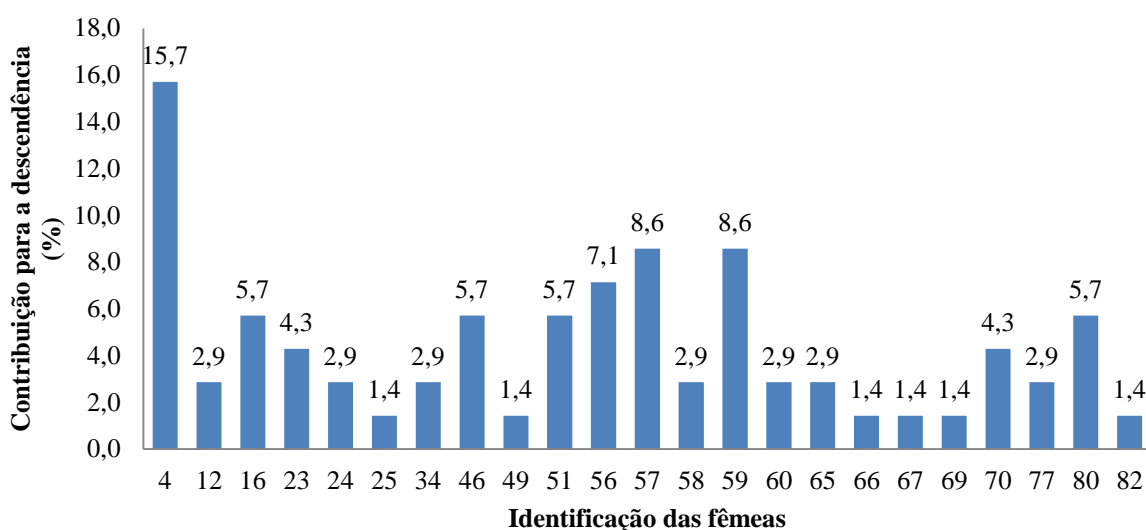


Figura 3.5 – Contribuição percentual de cada fêmea para a descendência da geração F1.

Quanto à contribuição para a descendência por parte dos indivíduos do sexo masculino da 1ª geração, verificou-se que os valores variaram entre 10,3% e 1,5% (**Figura 3.6**). Um macho apenas (indivíduo 55) contribuiu para a descendência com um total de 10,3% para a F2. Os restantes contribuíram individualmente 7,4% (dois machos), 5,9% (dois machos), 4,4% (oito machos), 2,9% (cinco machos) e 1,5% (nove machos).

Através do gráfico de cruzamento dos machos com as fêmeas da geração F1 (**Figura 3.7**), observou-se a ocorrência de um conjunto de machos que apenas se cruzaram com uma fêmea (machos 20, 22, 27, 32, 36, 44, 45, 78), embora essas fêmeas se tenham cruzado com outros machos.

No conjunto de machos que se cruzaram com mais do que uma fêmea observou-se que cada macho individualmente contribuiu para a descendência de cada fêmea geralmente nas mesmas proporções, com a exceção dos machos 5, 26, 30, 33 e 55.

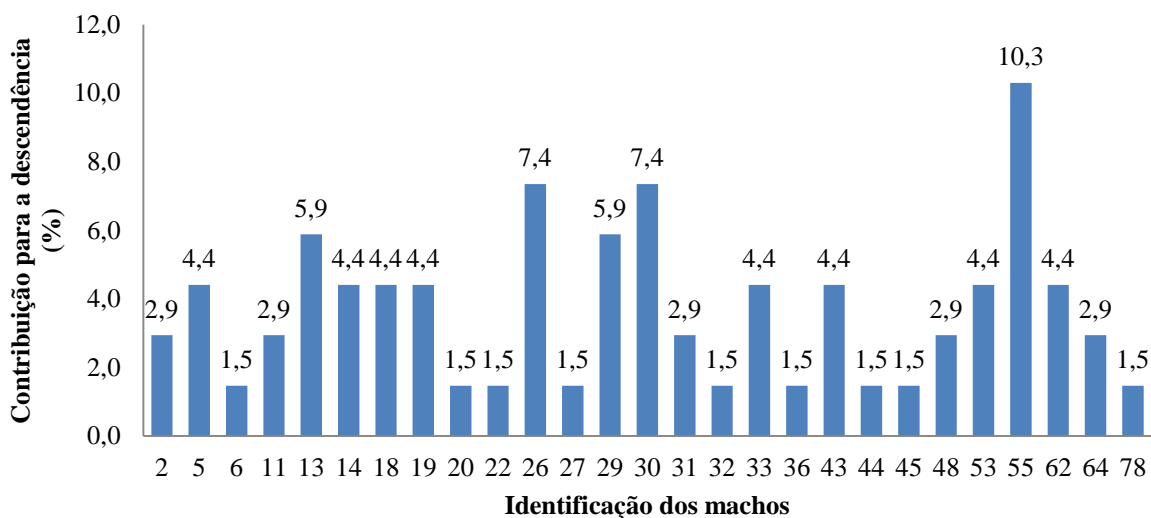


Figura 3.6 – Contribuição percentual de cada macho para a descendência da geração F1.

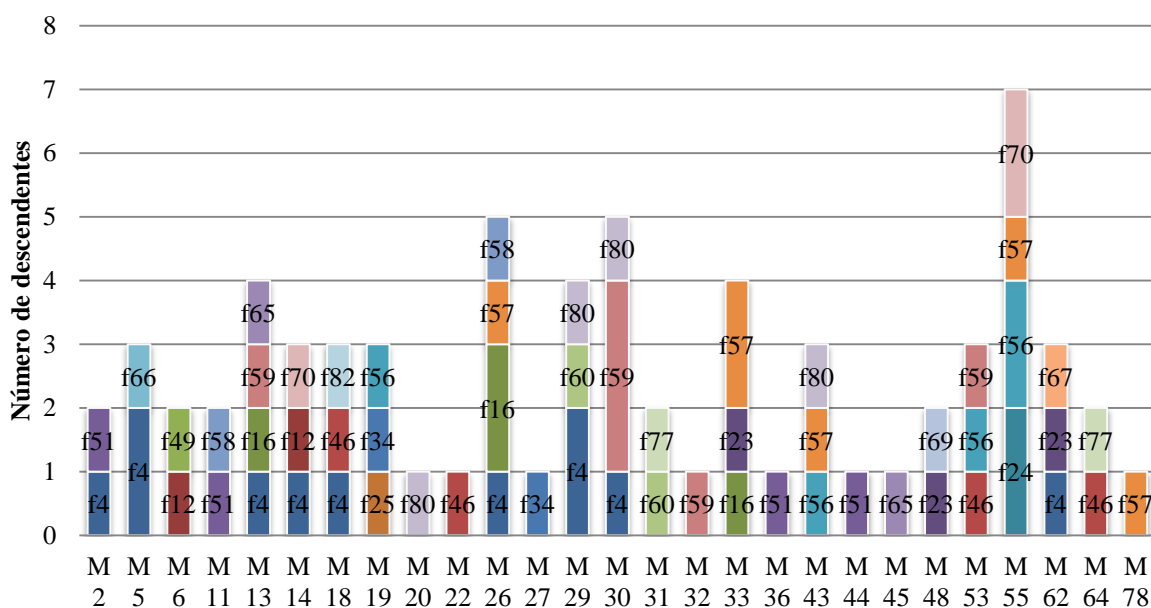


Figura 3.7 – Representação dos cruzamentos de cada macho com as fêmeas na geração F2 nas respectivas proporções numéricas. M: macho, f: fêmea.

3.3.2. F2 para F3

Na segunda simulação de paternidade referente à descendência da F2, previu-se a atribuição de paternidade a 31% e 66% da descendência com 95% e 80% de confiança respectivamente. Contudo, os valores obtidos da atribuição de paternidade situaram-se nos 4% para um nível de confiança de 95% e 34% para um nível de confiança de 80% (**Tabela 3.5**).

Tabela 3.5 – Representação da atribuição de paternidade (F2 para F3) esperada e observada em função de diferentes níveis de confiança.

Nível	Confiança (%)	Delta Crítico	Atribuições		Taxa de Atribuições	
			Observado	Esperado	Observado	Esperado
<i>Strict</i>	95	2,9	2	16	4%	31%
<i>Relaxed</i>	80	0,97	17	33	34%	66%
<i>Unassigned</i>			33	17	66%	34%
Total			50	50	100%	100%

A análise da contribuição de cada progenitor do sexo feminino isoladamente mostrou que das 22 fêmeas da F2, 19 (86%) contribuíram para a F3, e 3 (14%) não deixaram descendência (**Figura 3.8 A**).

A análise dos machos da F2 revelou, por sua vez, que em 46 indivíduos, apenas 22 (48%) contribuíram para a geração F3 e 24 (52%) não deixaram descendência (**Figura 3.8 B**).

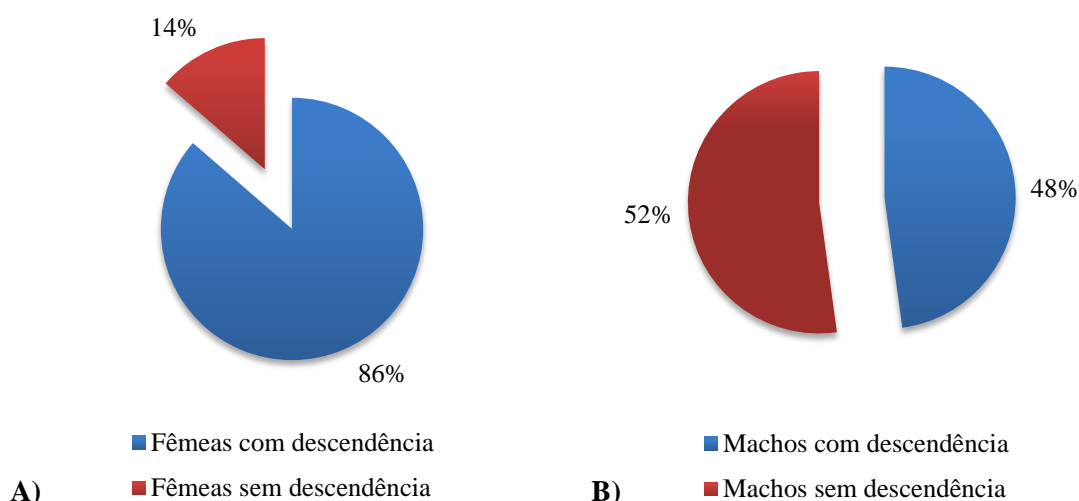


Figura 3.8 – Contribuição das fêmeas e dos machos F2 para a geração seguinte (F3).

Por observação do **Figura 3.9**, onde se encontrou representado a percentagem de contribuição das fêmeas da F2 para a geração F3, é claramente visível a presença da fêmea 2 que contribuiu com cerca de 22% para a geração seguinte. Com os segundos valores mais elevados encontraram-se as fêmeas 17 e 25 com 10% de contribuição (individualmente), seguidos de 8% para a fêmea 46 e 53. Abaixo destes valores a fêmea 4 contribuiu com 6% para a F3, e individualmente, cinco fêmeas contribuíram com 4% e outras oito com 2%.

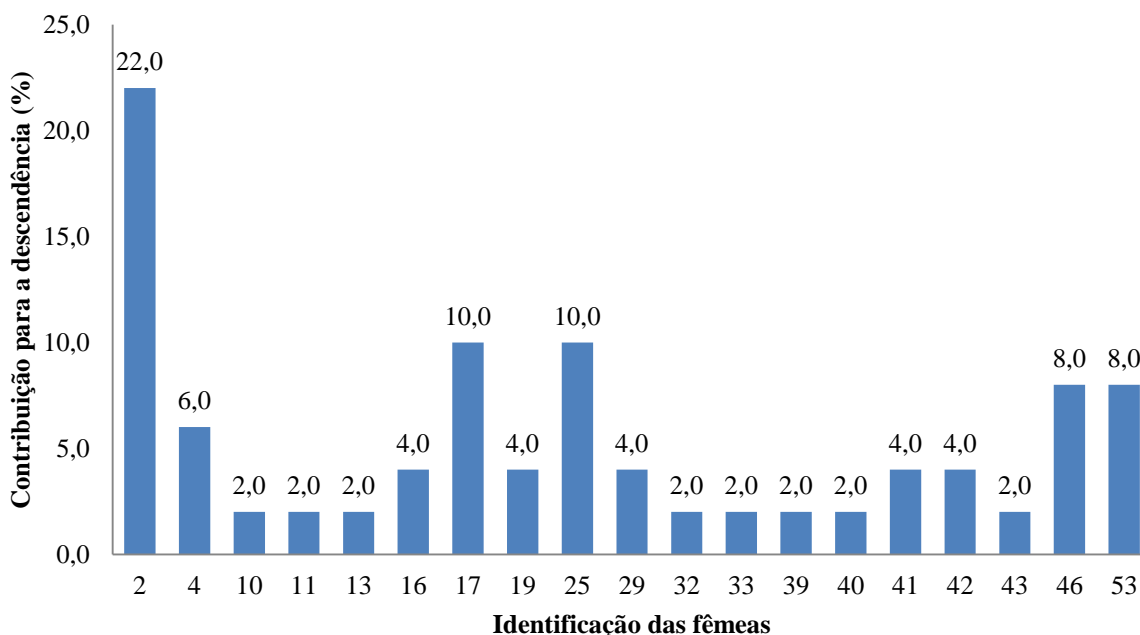


Figura 3.9 – Contribuição percentual de cada fêmea para a descendência da geração F2.

A contribuição para a F3 por parte dos machos da F2 demonstrou, mais uma vez, a presença de um macho (indivíduo 52) com maior percentagem de contribuição: 14%. Com valores inferiores verificaram-se, individualmente, os machos 31, 60 e 64, com 8%, seguidos dos indivíduos 20, 44, 65 e 73, com uma contribuição de 6%. Com valores de 4% e 2%, encontraram-se cinco e nove machos, respetivamente (**Figura 3.10**).

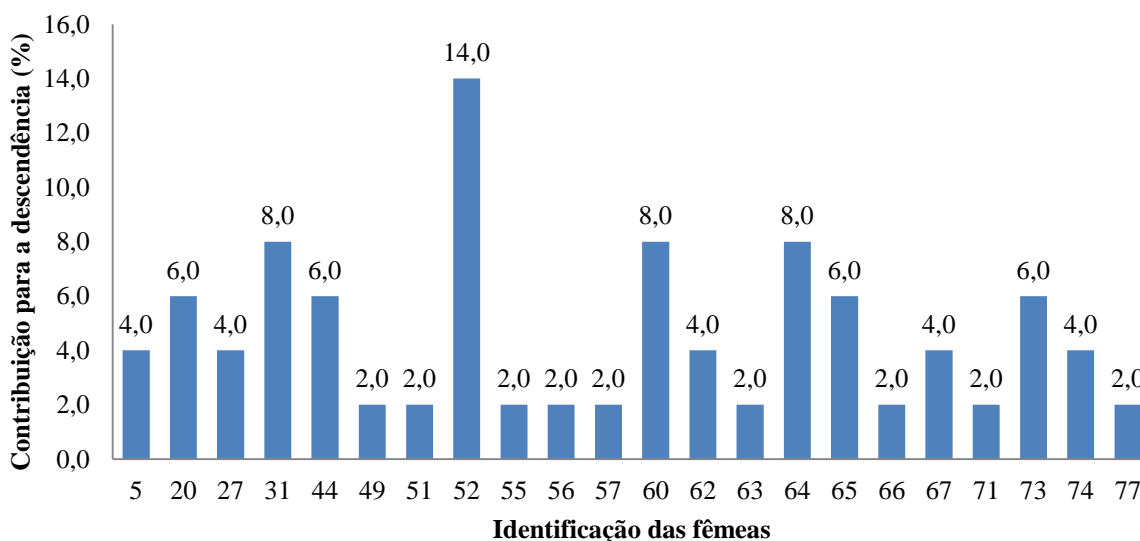


Figura 3.10 – Contribuição percentual de cada macho para a descendência da geração F2.

Na geração F2 ocorreram alguns machos que apenas se cruzaram com uma fêmea, sendo estes os machos 49, 51, 55, 56, 57, 63, 66, 71 e 77. Contudo, destes machos, os

indivíduos 57, 63, 66 e 77 cruzaram-se, cada um, com uma fêmea diferente que apenas gerou descendência de cada um destes machos, ou seja, dando origem a casais no caso destes quatro machos. As fêmeas que se cruzaram com os machos 57, 63, 66 e 77 são, respetivamente, a 40, 39, 33 e 32. Os restantes machos 49, 51, 55, 56 e 71, cruzaram-se com fêmeas que também geraram descendência de outros machos (**Figura 3.11**).

No conjunto de machos que se cruzaram com mais do que uma fêmea, verificou-se que todos se cruzam individualmente com proporções semelhantes, com exceção dos machos 52 e 60. O macho 52 gerou descendência de duas fêmeas, a 2 e a 17, numa proporção de cinco para dois, respetivamente. Por sua vez, o macho 60 cruzou-se com três fêmeas, a 4, a 16 e a 25, numa proporção de um para dois para um, respetivamente (**Figura 3.11**).

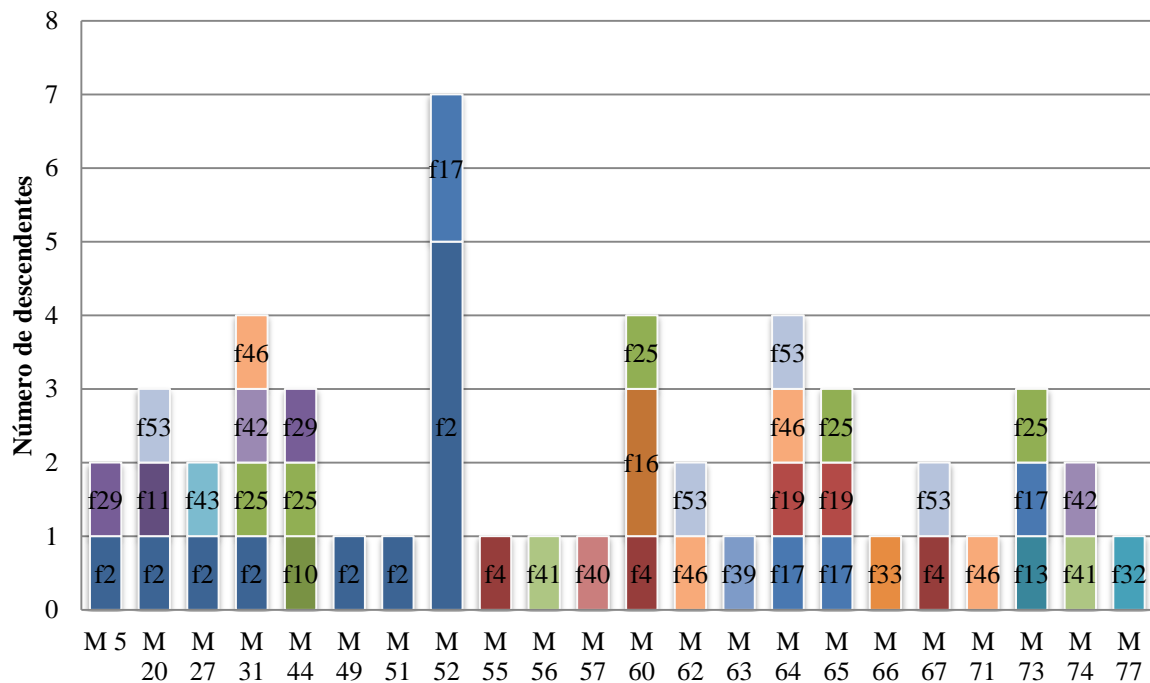


Figura 3.11 – Representação dos cruzamentos de cada macho com as fêmeas na geração F2 nas respetivas proporções numéricas. M: macho, f: fêmea.

4. Discussão

Este estudo constitui a primeira abordagem utilizando microssatélites como marcadores moleculares para a conhecer a variabilidade genética e o contributo parental em gerações sucessivas de choco produzidas em condições controladas. Na sequência do isolamento de microssatélites para o choco por Shaw e Pérez-Losada (2000), foram posteriormente desenvolvidos alguns estudos que permitiram conhecer as características genéticas de populações selvagens. Pérez-Losada *et al.* (2002) avaliaram a variabilidade genética e a estrutura populacional de diversas populações de choco ao longo da Península Ibérica, tanto na costa Atlântica como no Mar Mediterrâneo, caracterizando a variabilidade genética como elevada (H_e média = 0,725). No entanto, com a utilização dos mesmos microssatélites, a diversidade genética foi também verificada e comparada entre populações geograficamente mais afastadas desde do sul de Portugal até ao Canal da Mancha (Wolfram *et al.*, 2006). Posteriormente, verificou-se a presença de evidências de declínio da diversidade genética em algumas amostras de populações Atlânticas e Mediterrâneas (Pérez-Losada *et al.*, 2007), cujos autores relacionaram com a possível sobre-exploração da espécie.

Os trabalhos anteriormente referidos constituíram os alicerces necessários para o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que disponibilizaram as ferramentas moleculares necessárias à sua realização (Shaw e Pérez-Losada, 2000), nomeadamente o desenvolvimento de microssatélites para o choco, bem como a determinação dos indicadores de variabilidade genética das populações selvagens (Pérez-Losada *et al.*, 2002; Wolfram *et al.*, 2006; Pérez-Losada *et al.*, 2007). Estes são indicadores essenciais para estabelecer uma base de referência e comparativa para o estudo desenvolvido com exemplares produzidos em condições controladas.

4.1. Extração de ADN

A presença de ADN de diminuta qualidade e/ou quantidade, podem tornar ineficazes os processos pelos quais o mesmo pode ser amplificado, designadamente por *PCR*. Assim, para a utilização de marcadores moleculares, a existência de ADN de elevada qualidade constitui uma base fundamental (Aljanabi e Martinez, 1997; Hoffman e Amos, 2005). Durante as extrações de ADN efetuadas ao longo deste estudo, verificou-se que a técnica de extração salina utilizada não apresentou sempre a mesma eficácia. Aljanabi e Martinez (1997) provaram a utilidade da extração salina na obtenção de ADN de elevada qualidade para posterior amplificação por *PCR*. Todavia, o tecido utilizado pelos autores era fresco, ao contrário do tecido utilizado para a obtenção de ADN neste estudo, que se encontrou

conservado em etanol a 80%. No presente estudo, o ADN demonstrou a presença de proteínas e outros contaminantes, quando analisado em gel de agarose e, posteriormente, por espectrofotometria. A estrutura corporal dos cefalópodes é principalmente muscular, sendo o principal constituinte as proteínas (Kreuzer, 1984). No caso particular do choco, a musculatura do manto constitui 30% do total do peso corporal (Wells, 1990) e o seu metabolismo energético é semelhante ao de *Octopus vulgaris*, ambos baseados em proteínas (Tait, 1986). Tendo em conta o modelo animal utilizado neste estudo (*S. officinalis*) e as características referidas, talvez outro método de extração de ADN com rendimento superior deva ser ponderado. Em outros estudos com cefalópodes, alguns são os exemplos da utilização de outras técnicas de extração que obtiveram bons resultados. Murphy *et al.* (2002) utilizou com sucesso o método de extração de ADN com fenol-clorofórmio em amostras de *O. vulgaris*. Embora este método permita obter ADN com um grau de pureza elevado, este requer vários procedimentos laboratoriais que aumentam o risco de contaminação por transporte das amostras, sendo ainda necessários cuidados laboratoriais específicos devido à toxicidade dos solventes utilizados, em particular do fenol (Rivero *et al.*, 2006). Também pode ser referido o método de Chelex, utilizado igualmente em estudos com *O. vulgaris* (Söller *et al.*, 2000; Cabranes *et al.*, 2008). Este é um método de extração de troca catiónica e permite obter ADN bastante puro (Jacobsen e Rasmussen, 1992). É considerado simples e rápido e não envolve solventes orgânicos tóxicos (Walsh *et al.*, 1991). Por fim, a utilização de *kits* comerciais também constitui muitas vezes uma opção, uma vez que são métodos geralmente com maior sensibilidade e pureza. Contudo são financeiramente muito dispendiosos, em comparação com os métodos convencionais (Löffler *et al.*, 1997), não se tornando financeiramente rentável quando se pretende analisar um número elevado de amostras.

Outro fator que pode ter influenciado a qualidade do ADN extraído refere-se ao método utilizado para conservar as amostras de tecido até ao processo de extração. A preservação de tecidos em etanol ou isopropanol para posterior extração de ADN constitui uma prática comum (Sibley e Ahlquist, 1981; Nietfeldt e Ballinger, 1989). Contudo, existem outros métodos disponíveis para a preservação de tecidos. Seutin *et al.* (1991) sugerem a utilização da solução salgada DMSO (dimetilsulfóxido) como substituto do etanol. Além deste, encontram-se descritos diferentes soluções tampão para a preservação de tecidos, nomeadamente o tampão lise de Queen (Seutin *et al.*, 1991) e o tampão de Longmire (Longmire *et al.*, 1997).

Kilpatrick (2002) avaliou a capacidade de preservação de tecidos com três métodos químicos na ausência de refrigeração ou de congelação, e verificou que a utilização de etanol a 95% apresenta uma eficácia moderada na preservação do ADN, dando origem a grandes quantidades de ADN de baixo peso molecular. Outros autores constataram também que tecidos preservados em etanol originaram fragmentos extremamente degradados de ADN (Houde e Braun, 1988; Seutin *et al.*, 1991). Contudo, Kilpatrick (2002) considera que grande parte da degradação do ADN em tecidos armazenados em etanol ocorre durante o processo de extração em vez do processo de armazenamento. Por sua vez, a utilização da solução DMSO constitui um método de preservação tão eficaz como a criopreservação (Seutin *et al.*, 1991). Este é um método extremamente eficiente na preservação do ADN em tecidos, à temperatura ambiente, em períodos iguais ou superiores a 2 anos, e *PCR*'s realizados com ADN extraído destas amostras apresentam um rendimento superior ao de amostras conservadas com etanol ou tampão de Longmire, que apresentam diminuto rendimento (Kilpatrick, 2002)

Apesar da solução DMSO apresentar um custo moderado e elevada eficácia na preservação do ADN, a sua disponibilidade em comparação com o etanol pode limitar a sua utilização. Além do mais, o DMSO deve ser utilizado com alguma precaução, uma vez que provoca irritações cutâneas e pode servir como agente transportador, para o interior do corpo humano, de compostos tóxicos encontrados em amostras ou na pele. Por sua vez, o etanol é um composto de fácil acesso e que não necessita de precaução especial para a sua utilização, sendo até mais barato que o DMSO e o tampão de Longmire (Kilpatrick, 2002).

Neste estudo, as amostras foram conservadas em etanol a 80%, o que por si, pode ter diminuído o efeito da preservação do etanol, quando comparado com a utilização de uma concentração de 95%, ou superior. Todavia, as amostras foram mantidas no congelador a -20°C, condição que contribuiu para a conservação das amostras. No entanto, após as amostragens realizadas, o etanol não foi mudado, o que certamente contribuiu para a diminuição do rendimento da preservação, sendo a qualidade da preservação com etanol melhorada quando ocorre a renovação do mesmo após 2 ou 3 dias do armazenamento inicial (Kilpatrick, 2002).

4.2. Consanguinidade em gerações sucessivas

Na análise das três gerações consecutivas de *S. officinalis* em cativeiro, verificou-se a diminuição da diversidade alélica e de heterozigotia esperada, ambos indicadores da perda de diversidade genética. Os valores da diversidade alélica decresceram desde 9,4 até 7,4 na 3ª geração. Pérez-Losada *et al.* (2002) relataram, para amostras de choco originadas em Faro, o

valor médio do número de alelos de 10,7. Em 2006, para amostra da mesma área geográfica, Wolfram *et al.* (2006) verificaram valores semelhantes (10,9). É possível observar que desde a 1ª geração, a diversidade alélica apresenta um valor inferior ao reportado pelos autores referidos anteriormente. A causa desta diferença pode ser atribuída possivelmente ao efeito fundador, uma vez que a 1ª geração teve origem num conjunto de ovos obtidos na Ria Formosa (Faro) que pode não representar o conjunto genético total das populações residentes na área geográfica em causa. O efeito fundador é normalmente classificado como causador da redução de diversidade alélica, e da heterozigotia, embora para esta última ocorra com menos frequência (Hufbauer *et al.*, 2004; Pruett e Winker, 2005). No caso do salmão do Atlântico (*Salmo salar*), Skaala *et al.* (2004) verificaram que apenas 58% da riqueza alélica das populações selvagens estudadas se encontravam presente nas estirpes domésticas. Os autores justificaram a perda da diversidade alélica com o efeito fundador ou deriva genética ao longo das gerações nos programas de reprodução. O mesmo foi verificado para outras espécies marinhas como o *Ictalurus punctatus* (Simmons *et al.*, 2006), *Salmo clarki* (Allendorf e Phelps, 1980), *Haliotis rubra* e *Haliotis midae* (Evans *et al.*, 2004), e *Cyprinus carpio* (Thai *et al.*, 2007).

A heterozigotia esperada (H_e) decresceu desde 0,7505 (F1) até 0,7134 (F3), e aqui, o efeito fundador também deve ser considerado como causador desta diminuição de H_e , mas aquando da seleção dos indivíduos para as gerações seguintes. Ao compararmos estes valores com os reportados para populações selvagens com a mesma origem geográfica verificamos mais uma vez que a 1ª geração possui H_e inferior aos selvagens mesmo tendo origem selvagem. Pérez-Losada *et al.* (2002) observa H_e de 0,783 e Wolfram *et al.* (2006) H_e de 0,795. Esta diferença pode ser mais uma vez justificada pelo efeito fundador referido anteriormente. Quando o número efetivo de indivíduos fundadores diminui e o número de efeitos de gargalo aumenta, as populações seguintes apresentam valores de heterozigotia em múltiplos *loci*, proporções de *loci* polimórficos e número de alelos inferiores em comparação com a população que lhes deu origem (Leberg, 1992). A ocorrência desses efeitos de gargalo apresenta um efeito mais marcado na diversidade alélica que na heterozigotia (Nei *et al.*, 1975; Leberg, 1992), sendo a redução da diversidade alélica em microssatélites com espécies cultivadas bastante frequente (Desvignes *et al.*, 2001).

Embora se verifique um perfil decrescente neste estudo nos resultados da diversidade alélica e da heterozigotia esperada de geração para geração, os valores de heterozigotia observada (H_o) retratam uma situação diferente. H_o cresce desde 0,4346 na geração F1 até 0,614 na geração F3. Estes valores são substancialmente diferentes aos observados por outros

autores para populações selvagens, com valores de H_o de 0,700 e 0,701 (Pérez-Losada *et al.*, 2002; Wolfram *et al.*, 2006). Contudo, embora o valor reduzido de H_o possa ser remetido para o efeito fundador, este parâmetro aumenta desde a 1ª até à 3ª geração. Numa situação de cultivo com gerações sucessivas onde é esperado que a variabilidade genética diminua, se não forem optadas medidas para compensar a percentagem de consanguinidade por geração, H_o apresenta um perfil duvidoso. Ao analisar a heterozigotia esperada e observada é sempre necessário ter uma certa prudência no valor efetivo destes parâmetros. Tipicamente, verifica-se que H_o é mais sensível à variação do número de amostras que H_e (Frankham *et al.*, 2004). Tendo em conta que, para cada *locus* e de geração para geração o número efetivo de amostras analisadas variava em função da dificuldade em amplificar e genotipar todos os *loci* para todos os indivíduos, esta pode ter tido um papel importante nas diferenças da heterozigotia observada. Além do mais, a heterozigotia é considerada uma medida da variabilidade genética imperfeita, uma vez que o número e distribuição dos alelos são variáveis importantes. A heterozigotia, por si só, é insensível ao número de alelos, tendo apenas em conta a frequência alélica, uma vez que podemos obter elevados valores de heterozigotia até com apenas dois alelos (Beardmore *et al.*, 1997). Desta forma, uma correta avaliação genética deve considerar ambos os estimadores para evitar conclusões que podem não ser corretas com base num único estimador, sendo a diversidade alélica um estimador mais sensível a diferenças na variação genética em populações selvagens e populações cultivadas e até entre si, em comparação com a heterozigotia média (Norris *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2004). Embora os valores do coeficiente de consanguinidade (F_{is}) também tenham demonstrado uma tendência de se aproximar de 0, levando à diminuição de homozigóticos, este depende diretamente de H_o e, como tal, também depende diretamente das frequências alélicas em detrimento do número de alelos. Desta forma, o valor deste parâmetro deve ser interpretado com a mesma cautela que o da heterozigotia.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) constitui uma medida de polimorfismo que considera o número de alelos num *locus* marcado, e as suas frequências. Consequentemente, *loci* com número elevado de alelos geralmente possuem PIC's superiores. Contudo, a frequência desses alelos também influencia o PIC, sendo desta forma possível ter elevado número de alelos e um PIC relativamente pequeno quando um ou dois alelos são predominantes (Buchanan e Thue, 1998). Nas gerações F1, F2, e F3, o *locus* Sof7b mostrou ser o marcador com valor de PIC mais reduzido, com valores de 0,575, 0,607 e 0,519, respetivamente. Todos os restantes *loci* variaram com valores superiores, sendo o PIC máximo registado para as três gerações de aproximadamente 0,8 (F1 Sof6= 0,809; F2 Sof3c=

0,821; $F_3 \text{ Sof3c} = 0,811$). Botstein (1980) formulou que com $\text{PIC} > 0,5$ o *locus* é altamente informativo, entre 0,5 e 0,25 o *locus* é razoavelmente informativo, e com $\text{PIC} < 0,25$ o *locus* é apenas ligeiramente informativo. Desta forma, com o conjunto de valores calculados neste estudo, é possível afirmar que todos os sete *loci* analisados são altamente informativos, uma vez que todos são superiores a 0,5.

O princípio de Hardy-Weinberg assume que numa grande população com cruzamentos aleatórios, sem seleção, mutação ou migração, as frequências alélicas e as frequências genóticas são constantes de geração em geração, sendo a população designada como estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Guo e Thompson, 1992; Bourgain *et al.*, 2004). Quando é testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg em populações com elevado nível de consanguinidade, entende-se necessário especificar as hipóteses a serem testadas (Bourgain *et al.*, 2004). Devido à natureza deste estudo, é assumido que não ocorre migração nem mutação. Desta forma, apenas dois fatores podem ter atuado sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg, nomeadamente seleção e/ou cruzamentos não aleatórios.

Quando ocorrem desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg num ou outro *locus*, este pode ser atribuído ao efeito da seleção natural. No entanto, desvios em um ou dois *loci* constituem geralmente um indicador de problemas relacionadas com a genotipagem, como a segregação de alelos nulos, ou a presença de *loci* ligados ao sexo. Desvios em vários ou todos os *loci* constituem um indicador de subestruturação populacional. A população pode estar dividida num conjunto de grupos familiares consanguíneos ou pode ocorrer hibridação entre espécies geneticamente diferenciadas, subespécies, raças, ou até populações diferentes. Quando tal acontece, o nível de confiança das atribuições de paternidade deve ser interpretado com cuidado (Kalinowski *et al.*, 2007).

Na 1ª geração, todos os *loci*, à excepção do Sof3c e do Sof4b, apresentaram desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. A causa mais provável para estes desvios deve ser atribuída à seleção de um conjunto de ovos com origem na Ria Formosa, possivelmente não representativos de toda a população selvagem, ou seja, mais uma vez é indiciada a ocorrência de um efeito fundador na seleção dos ovos que deram origem à geração F1. Na geração F2, dois *loci* não apresentaram desvios significativos (Sof4b e Sof5), mas devido à presença de dados insuficientes, apenas se verificou significância para três *loci* (Sof2b, Sof6, e Sof7b), não podendo ser apurados a presença de desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg nos *loci* Sof1 e Sof3c. No entanto, a causa dos desvios presentes deve ser atribuída mais uma vez ao efeito da primeira seleção de ovos com origem na Ria Formosa, bem como o efeito da seleção de ovos da geração F1 que deram origem à geração F2.

Contudo, o possível efeito de cruzamentos não aleatórios verificados a partir da análise da contribuição parental, não deve ser descartado. A análise da geração F3 não apresentou desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, apesar dos *loci* Sof3c e Sof4b não tenham entrado na análise por falta de dados. Embora alguns *loci* não tenham sido analisados nas gerações F2 e F3, parece que de geração em geração, as populações tendem para o equilíbrio. A presença de cruzamentos não aleatórios verificados posteriormente na análise parental, parecem não possuir o peso necessário para originar, no caso da 3ª geração, desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em suma, é clara a perda de variabilidade genética ao longo de três gerações sucessivas de cultivo de *S. officinalis* por observação da diversidade alélica e da heterozigotia esperada, embora H_o apresente valores díspares de H_e , e F_{is} se aproxime de 0. Em populações com cruzamentos aleatórios entre machos e fêmeas, os valores de heterozigotia esperada e observada são geralmente semelhantes. Quando os valores são consideravelmente diferentes, estes podem constituir um indicador da presença de sistemas de cruzamento entre os indivíduos não aleatório (Frankham *et al.*, 2004). A presença de desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em quase todos os *loci* na geração F1 e F2 sustenta esta hipótese, apesar de não constituir a única causa de desvios a este princípio. Desta forma a análise da contribuição parental constitui uma ferramenta indispensável para compreender as interações sexuais entre os indivíduos deste estudo nas condições de cativeiro utilizadas.

4.3. Análise parental

Em ambas as gerações parentais analisadas, as taxas de atribuição de paternidade esperada (simulada) e a observada não são semelhantes, sendo os valores observados para os níveis de confiança considerados (95% e 80%) bastante inferiores em comparação com o esperado. O programa CERVUS realiza a simulação de atribuição de paternidades através do uso das frequências alélicas obtidas pela análise dos resultados da genotipagem. Para cada nível de confiança considerado o programa efetua a simulação tendo em consideração um conjunto de parâmetros introduzidos e calcula os valores críticos de LOD e Delta, utilizados para classificar a probabilidade dos possíveis progenitores. Aquando da efetiva análise de paternidade, o programa utiliza os valores críticos obtidos através da simulação para calcular a verosimilhança dos progenitores candidatos com a prole (Kalinowski *et al.*, 2007). Como neste caso, foram obtidos valores diferentes entre as taxas de atribuição de paternidade esperada e observada, é possível atribuir esta observação, a um de dois fatores. Em primeiro lugar, os parâmetros introduzidos para a simulação podem não ter sido os mais adequados,

resultando em valores críticos subvalorizados, dando origem a que uma grande parte das atribuições de paternidade seja realizada com níveis de confiança mais reduzidos sem necessidade. Em segundo lugar, os erros de genotipagem observados neste estudo podem ter diminuído a confiança da análise de paternidade. A última hipótese parece ser a mais correta, uma vez que os erros de genotipagem representam uma importante causa na diminuição da potência dos testes de atribuição parental (Vandeputte *et al.*, 2006). Contudo, devido à presença de desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, presentes em quase todos os *loci*, o nível de confiança das atribuições de paternidade deve ser interpretado com cuidado (Kalinowski *et al.*, 2007).

Na análise parental das gerações F1 e F2 verificou-se que, em ambos os casos, ocorre uma diferença na quantidade de machos e de fêmeas que, efetivamente contribuíram para a geração seguinte. Na geração parental F1, 8% das fêmeas não contribuíram para a geração F2, e na F2 parental 14% das fêmeas também não contribuíram para a geração F3. Embora com estes valores, praticamente todas as fêmeas tenham contribuído para as gerações seguintes, o mesmo não acontece no caso dos machos. Com estes verificou-se que em ambas as gerações parentais F1 e F2, 36% e 52% dos machos não deixaram descendência, respetivamente. Em termos de números efetivos estas percentagens correspondem a 27 (F1) e 22 (F2) machos que contribuíram para a geração seguinte, sendo números semelhantes ao número de fêmeas que também deixaram descendência (23 na F1 e 19 na F2). Tendo em conta que a proporção de machos para fêmeas correspondia a 2:1, observa-se que o número efetivo de indivíduos reprodutores que deixaram descendência é aproximadamente de 1:1. Esta observação parece levar à consideração da tentativa de formação de casais de forma natural, sem interferência humana. No sul de França, Sel e Daguzam (1997), observaram em populações de *S. officinalis* capturadas através do uso de redes e de armadilhas, o rácio sexual de 1:1. Todavia, para outras espécies do mesmo género, nomeadamente *Sepia apama*, verificou-se um rácio sexual operacional de 4:1 (Hall e Hanlon, 2002).

Contudo, ao observar os cruzamentos entre indivíduos, verificou-se que praticamente não ocorre a formação de verdadeiros casais e que a maior parte dos machos cruzou-se com diversas fêmeas. Na geração parental F1 verificou-se a existência de um determinado conjunto de machos (num total de 8) que escolheu, ou, pelo menos, só teve a oportunidade de gerar descendência com uma fêmea. Todavia, estas fêmeas também obtiveram descendência com outros machos. Na geração parental F2, o mesmo aconteceu com um determinado conjunto de machos (49, 51, 55, 56, 71), mas também advêm verdadeiros casais (57, 63, 66, 77). Provavelmente devido à elevada competição que ocorre no ambiente de cultivo entre

machos para obtenção de uma parceira, uma vez que existem o dobro de machos que fêmeas, este não deve proporcionar a formação de verdadeiros casais.

Segundo Hanlon *et al.* (1999), a competição espermática constitui um aspeto fulcral no sistema de acasalamento de *S. officinalis* e que a fidelidade de pares é muito breve, medida entre 2 a 20 minutos (Boal, 1997; Hanlon *et al.*, 1999). Encontra-se descrito um processo denominado de *flushing* por parte dos machos de *S. officinalis*, que consiste na remoção de parte dos espermatangios nas fêmeas que tinham estado com outro parceiro anteriormente, sendo um processo que apenas é eficaz durante um curto espaço de tempo após a deposição das mesmas na fêmea (Birkhead and Moller, 1998; Hanlon *et al.*, 1999). Tendo em conta as considerações prévias, é de ponderar a ocorrência de dois processos que podem influenciar por quantos machos uma fêmea é fecundada num determinado período ou em diversos períodos temporais durante a época de reprodução. O primeiro processo é a ocorrência de competição direta entre dois ou mais machos que efetivamente conseguem assegurar a fêmea durante um determinado período de forma a garantir a sua prole. Por outro lado, ao mesmo tempo, poderá estar a ocorrer uma competição “indireta” entre esses machos e aqueles que não conseguem assegurar uma fêmea e por conseguinte não geram descendência, exercendo uma pressão sobre os machos que efetivamente se conseguem reproduzir.

Estes dois processos em conjunto devem reduzir o tempo que os machos guardam as fêmeas após a copulação, sendo este período já em si curto (Boal, 1996, Hanlon *et al.*, 1999). Com a diminuição do período de guarda das fêmeas, o seguinte processo de *flushing* e copulação por parte doutro macho reprodutor, este consegue assegurar também alguma descendência com a fêmea. A juntar a estes processos, existe ainda a possibilidade de cópula por *sneaker males*. Estes são machos normalmente mais pequenos que realizam táticas de acasalamento parasitária. A sua aparência é geralmente mais discreta, sendo assim mais difícil de serem detetados pelos machos dominantes (Taborsky, 1994; Taborsky 2001). Este comportamento encontra-se documentado para *S. officinalis* bem como para *S. apama*, embora com sucesso diferenciado (Adamo *et al.*, 2000; Hall e Hanlon, 2002). Contudo, a existência desta tática em *S. officinalis* não implica que o macho não guarda a fêmea, mas antes que o macho mais pequeno se faz passar por fêmea, conseguindo copular com sucesso com a fêmea em causa.

Visto que a proporção de machos é o dobro das fêmeas, embora metade dos machos não consiga assegurar descendência mesmo existindo a possibilidade de terem copulado, o elevado nível de competição leva a que as fêmeas no momento da fecundação dos ovos

utilizem um conjunto de espermatozoides originários de um número determinado de machos. Considerando o elevado número de espermatozoides transferidos em cada cópula, parece que uma tática dos machos é de inundar a membrana bucal e o receptáculo seminal com espermatozoides de forma a diluir o espermatozoides dos machos que copularam anteriormente (Hanlon *et al.*, 1999).

Tendo em vista este cenário, a capacidade que um macho tem de contribuir mais para a geração seguinte, encontra-se relacionado com o número de fêmeas com que copulou, em que período temporal antes da fecundação, e durante quanto tempo guardou a fêmea. Desta forma os últimos machos a copular possuem maior probabilidade de gerar descendência, visto o seu espermatozoides encontrar-se menos diluído.

4.4. Erros de genotipagem

Na análise parental pelo método de exclusão, usando múltiplos *loci* polimórficos, os erros de genotipagem constituem uma das principais causas da redução da capacidade de atribuição de paternidades (Vandeputte *et al.*, 2006). A aquisição de genótipos errados tem a capacidade para distorcer a identificação individual (Paetkau, 2003), tal como a posterior análise parental (Miller *et al.*, 2002). Kalinowski *et al.* (2007) afirmam que a estimação de relações de parentesco é notoriamente vulnerável a erros de genotipagem. Este problema é particularmente relevante porque um único erro de genotipagem pode excluir um verdadeiro progenitor, independentemente do número de *loci* considerados. Na verdade, se os erros de genotipagem não forem considerados durante a análise dos dados, aumentar o número de *loci* irá aumentar provavelmente a falsa exclusão.

Encontra-se descrito um diverso intervalo de erros de genotipagem, que varia desde 1%, ou até menos (Hoffman e Amos, 2005), até valores mais elevados de 17-29% em alguns casos (Maudet *et al.*, 2004). Neste estudo verificou-se a presença de alelos nulos entre 8% e 13% (Sof1=0,083; Sof5=0,094; Sof7b=0,133), constituindo estes valores uma percentagem de erro considerável. Para *S. officinalis*, apenas Pérez-Losada *et al.* (2002) reporta a possibilidade de presença de alelos nulos mas apenas para os *loci* Sof4 e Sof7 por mutações na zona de flanqueamento da sequência. A presença de elevados valores de alelos nulos pode constituir a principal causa do aumento do número de alelos verificados para os *loci* Sof1 e Sof5, e valores inicialmente baixos do número de alelos para o *locus* Sof7b em comparação com os outros *loci*. A incapacidade de genotipar determinados alelos neste trabalho deve ser atribuída em geral à qualidade e/ou quantidade do ADN. Contudo, a possibilidade de mutação na região dos oligos não deve ser descartada, principalmente para o *locus* Sof5, que segundo Shaw e Pérez-Losada (2000), exibe um complexo de alelos indicativos de um processo de

mutação *nonstepwise*. Todavia, também é importante notar que os três *loci* que apresentam as percentagens de alelos nulos descritos anteriormente, são os mesmos três *loci* segundo os quais foi descrito a existência de *linkage disequilibrium* entre si (Shaw e Pérez-Losada, 2000), embora o *locus* Sof7 tenha sido modificado neste estudo (Sof7b). Os efeitos do *linkage disequilibrium* englobam a diminuição da probabilidade esperada de exclusão e da exatidão das atribuições de parentesco (Chakraborty e Hedrick, 1983), uma vez que associações não aleatórias entre *loci* reduzem a quantidade de variação genética útil para a determinação parental (Devlin *et al.*, 1988).

A presença de erros de genotipagem afetam as estimativas das frequências alélicas bem como a discriminação precisa de diferentes genótipos (Bonin *et al.*, 2004; Pompanon *et al.*, 2005). A estimativa de frequências alélicas incorretas pode dar origem a um aumento artificial de homozigóticos (Taberlet *et al.*, 1996), uma sobrestimação da consanguinidade (Taberlet *et al.*, 1999), e até a falsos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Xu *et al.*, 2002). Com as percentagens de erro referidas anteriormente (alelos nulos entre 8% e 13%), os resultados referentes à heterozigotia observada, ao coeficiente de consanguinidade, e aos desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, devem ser interpretados com alguma cautela. Contudo, a influência dos erros sob os resultados referidos não devem ser valorizados da mesma forma que os efeitos dos mesmos sob a análise de paternidade. Segundo Taberlet *et al.* (1999), as análises baseadas em frequências alélicas não são tão afetadas pelos erros de genotipagem como as análises baseadas na identificação individual, nomeadamente a análise de paternidades, mas são, por sua vez, mais sensíveis aos efeitos de amostragem.

5. Considerações finais

Com o trabalho realizado, foi possível conhecer a variabilidade genética e a contribuição parental de três gerações de cultivo sucessivo do choco *Sepia officinalis*. Verificou-se que o método de extração de ADN por precipitação salina produziu amostras de qualidade variável, o que poderá ter influenciado a capacidade de atribuição de paternidades, reduzindo a sua confiança, apesar de este ser um método economicamente vantajoso.

Através dos 7 *loci* analisados, constatou-se a diminuição da variabilidade genética de geração para geração, através da observação do número de alelos e da heterozigotia esperada. Os valores obtidos de heterozigotia observada, inicialmente pareciam não descrever a situação em causa, encontrando-se a explicação destes valores no padrão de cruzamentos entre os indivíduos. Os desvios sistemáticos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg nas duas primeiras gerações, sugeriram a presença de seleção e/ou cruzamentos não aleatórios, encontrando-se o processo de seleção a ocorrer num primeiro momento durante a obtenção dos ovos selvagens para dar origem à geração F1, e posteriormente no momento de seleção dos ovos entre gerações, originando vários efeitos fundadores.

Os resultados da análise de paternidades revelaram que, na proporção de sexos utilizada neste estudo (2 machos para 1 fêmea), ocorreu um sistema de cruzamentos em que apenas um determinado número de machos contribuiu para a prole da geração seguinte, dando origem a proporções sexuais efetivas de aproximadamente 1:1. Observou-se um padrão de cruzamentos nos machos que contribuíram para a geração seguinte, em que a maior parte destes fecundou com sucesso mais do que uma fêmea. Porém, alguns machos da geração F1 apenas conseguiram gerar descendência com 1 fêmea, e na geração F2 verificou-se até a ocorrência de casais, onde o macho e a fêmea só geraram descendência entre si. Com este mapa de cruzamentos, ocorreu a perda de alelos de geração para geração, uma vez que apenas uma parte dos machos contribuiu para a prole. Todavia, o facto de estes machos cruzarem-se com diversas fêmeas, permitiu obter valores de frequências alélicas favoráveis até ao crescimento da heterozigotia observada de geração para geração, apesar de se considerar que tenha ocorrido um processo de perda de variabilidade genética.

A contribuição parental observada, juntamente com os efeitos fundadores criados na seleção dos ovos entre gerações, constituem a principal causa de perda de diversidade genética e o aumento da consanguinidade, culminando possivelmente ao fim de mais algumas gerações, à consequência última da inviabilidade e do colapso da população de cultivo. Contudo, deve-se considerar que outros fatores podem contribuir para acelerar ou atrasar este

colapso como a composição da dieta (Sykes *et al.*, 2006b) ou aspetos relacionados com a vida em cativeiro como a existência de populações de bactérias simbióticas (Forsythe *et al.*, 1994).

Com o objetivo de mitigar os efeitos negativos da consanguinidade, futuros programas de cultivo com o choco devem focar os aspetos causadores da perda de variabilidade genética, de forma a conseguir manter um número superior de gerações sucessivas em cativeiro com considerável saúde genética. Primeiramente, a geração F1 deve ser a mais representativa possível das populações selvagens. Para tal, a obtenção de ovos deve ter origem não só em diferentes conjuntos de ovos, mas também de locais ligeiramente afastados de forma a minimizar o efeito negativo das subpopulações selvagens na variabilidade genética da geração F1. Posteriormente, a escolha dos ovos entre gerações deve constituir um processo o mais aleatório possível de forma a obter ovos de todas as fêmeas com as diferentes contribuições por parte dos machos. Idealmente, a proporção sexual de machos e fêmeas nos tanques para a espécie em estudo deveria ser mantida num rácio de 1:1. Contudo, os indivíduos não maturam todos ao mesmo tempo, sendo difícil manter um rácio sexual efetivo de 1:1. Desta forma, é necessário determinar as dimensões e volumes dos tanques e as densidades ótimas para a ocorrência natural do rácio entre machos e fêmeas, sendo assim possível diminuir consideravelmente a competição entre os machos para que todos eles possam contribuir para o conteúdo genético da prole.

A considerável percentagem de erros de genotipagem observados devido à presença de alelos nulos, juntamente com o *linkage disequilibrium* já descrito anteriormente por outros autores para os *loci* Sof 1, Sof 5 e Sof7, são fatores a ter em conta na análise computacional. Assim, estudos futuros usando estes *loci*, devem ser realizados de forma a acomodar todas estas fontes de diminuição da capacidade de atribuição de paternidades, aquando da análise computacional com o objetivo de aumentar a confiança dos resultados e se tal não for possível, recorrer à utilização de outros marcadores moleculares.

6. Referências bibliográficas

- Adamo, S.A., Brown, W.M., King, A.J., Mather, D.L., Mather, J.A., Shoemaker, K.L., Wood, J.B. 2000. Agonistic and reproductive behaviors of the cuttlefish *Sepia officinalis* in a semi-natural environment. *Journal of Molluscan Studies*, 66, 417-419.
- Alberto, F. 2009. MsatAllele_1.0: An R package to visualize the binning of microsatellite alleles. *Journal of Heredity*, 100, 394-397.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692-4693.
- Allendorf, F.W., Phelps, S. 1980. Loss genetic variation in hatchery stock of cutthroat trout. *American Fisheries Society*, 109, 537-543.
- Amaratunga, T. 1983. The role of cephalopods in the marine ecosystem. In Caddy, J.F., ed Advances in the assessment of world cephalopod resources. *FAO Fisheries Technical Paper*, 231, 379-412.
- Avise, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. *Sinauer*, Sunderland, Mass, 541p.
- Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I. 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research*, 28, 829-839.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, França.
- Birkhead, T.R., Moller, A.P. 1998. Sperm competition and sexual selection. *Academic Press*, London, 826p.
- Boal, J.G. 1996. Absence of social recognition in laboratory-reared cuttlefish, *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). *Animal Behaviour*, 52, 529-53
- Boal, J.G. 1997. Female choice of males in cuttlefish (Mollusca: Cephalopoda). *Behaviour*, 134, 975-988.
- Boletzky, S., Hanlon, R.T. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod mollusks. *Memoirs of the National Museum of Victoria*, 44, 147-187.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, P.B., Pompanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13, 3261-3273.

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- Boucaud-Camou, E. 1990. La seiche, an animal d'avenir. *La Peche Maritime*, 69, 321-329.
- Bourgain, C., Abney, M., Schneider, D., Ober, C., McPeck, M.S. 2004. Testing for Hardy-Weinberg equilibrium in samples with related individuals. *Genetics Society of America*, 168, 2349-2361.
- Buchanan, F.C., Thue, T.D. 1998. Intra-breed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 78, 425-428.
- Cabranes, C., Fernandez-Rueda, P., Martínez, J.L. 2008. Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation. *ICES Journal of Marine Science*, 65, 12-16.
- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Chavarrías, D., Merino, P., Sánchez, L., Martínez, P. 2007. A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 272S1, S210-S216.
- Chakraborty, R., Hedrick, P.W. 1983. Paternity exclusion and the paternity index for two linked loci. *Human Heredity*, 33, 12-23.
- Chesser, R.K., Baker, R.J. 1996. Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics*, 144, 1225-1235.
- Chevolut, M., Ellis, J.R., Rijnsdorp, A.D., Stam, W.T., Olsen, J.L. 2007. Multiple Paternity Analysis in the Thornback Ray *Raja clavata* L. *Journal of Heredity*, 98, 712-715.
- Cruz, P., Ibarra, A.M., Mejia-Ruiz, H., Gaffney, P.M., Pérez-Enríquez, R. 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine Biotechnology*, 6, 157-164.
- Delgado, C.L., Wada, N., Rosegrant, M.W., Meijer, S., Ahmed, M. 2003. Fish to 2020 - Supply and Demand in Changing Global Markets. WorldFish Center Technical Report 62. International Food Policy Research Institute and WorldFish Center. International Food Policy Research Institute, Washington, D.C. & WorldFish Center Penang, Malaysia. 236p.

- Denk, A.G., Gautschi, B., Carter, K., Kempenaers, B. 2004. Seven polymorphic microsatellite loci for paternity assessment in the mallard (*Anas platyrhynchos*). *Molecular Ecology Notes*, 4, 506-508.
- Desvignes, J.F., Laroche, J., Durant, J.D., Bouvet, Y. 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture*, 194, 291-301.
- Devlin, B., Roeder, K., Ellstrand, N.C. 1988. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 76, 369-380.
- Domingues, P.M., Kingston, T., Sykes, A., Andrade, J.P. 2001a. Growth of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (L., 1758) at the upper end of the biological distribution temperature range. *Aquaculture Research*, 32, 923-930.
- Domingues, P.M., Sykes, A., Andrade, J.P. 2001b. The use of Artemia or mysids as food for hatchlings of the cuttlefish *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758: effects on growth and survival throughout the life cycle. *Aquaculture International*, 9, 319-331.
- Eldik, P., Waaij, E.H., Ducro, B., Kooper, A.W., Stout, T.A.E., Colenbrander, B. 2006. Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. *Theriogenology*, 65, 1159-1170.
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P., Elliott, N.G. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis mida*). *Aquaculture*, 233, 109-127.
- FAO. 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 197p.
- FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 209p.
- FAO. Species Fact Sheets – *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). FAO Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/species/2711/en>
- Forsythe, J., DeRusha, R., Hanlon, R. 1994. Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. *Journal of Zoology*, 233, 175-192.

- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2004. A Primer of Conservation Genetics. *Cambridge University Press*, New York, 220p.
- Gjerde, B., Gunnes, K., Gjedrem, T. 1983. Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture*, 34, 327-332.
- Glasel, J.A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18, 62-63.
- Guerra, A. 2006. Ecology of *Sepia officinalis*. *Vie et Milieu – Life & Environment*, 56, 97-107.
- Guo, S.W., Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- Hall, K.C., Hanlon, R.T. 2002. Principal features of the mating system of a large spawning aggregation of the giant Australian cuttlefish *Sepia apama* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology*, 140, 533-545.
- Hanlon, R.T., Ament, S.A., Gabr, H. 1999. Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). *Marine Biology*, 134, 719-728.
- Hanlon, R.T., Turk, P.E., Lee, P.G. 1991. Squid and cuttlefish mariculture: an update perspective. *Journal of Cephalopod Biology*, 2, 31-40.
- Hearne, C.M., Ghosh, S., Todd, J.A. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 288-94
- Held, P.G. 2001. Nucleic acid purity assessment using A_{260}/A_{280} ratios. *BioTek, Application Note*.
- Hoffman, J.I., Amos, W. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 14, 599-612.
- Houde, P., Braun, M.J. 1988. Museum collections as a source of DNA for studies of avian phylogeny. *The Auk*, 105, 773-776.
- Hufbauer, R.A., Bogdanowicz, S.M., Harrison, R.G. 2004. The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidius ervis*, a parasitoid wasp. *Molecular Ecology*, 13, 337–348.
- Ireland, J.S., Broderick, A.C., Glen, F., Godley, B.J., Hays, G.C., Lee, P.L.M., Skibinski, D.O.F. 2003. Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in

green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219, 149-160.

- Jacobsen, C.S., Rasmussen, O.F. 1992. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2458-2462.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.
- Kilpatrick, C.W. 2002. Noncryogenic preservation of mammalian tissues for DNA extraction: An assessment of storage methods. *Biochemical Genetics*, 40, 53-62.
- Kreuzer, R. 1984. Cephalopods: handling, processing and products. *FAO Fisheries Technical Paper*, 254, 1-108.
- Kunisaki, N. 2000. Nutritional Properties of Squid and Cuttlefish. In Okuzumi, M., Fujii, T., ed Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish. *National Cooperative Association of Squid Processors*, Japan, 218p.
- Leberg, P.L. 1992. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution*, 46, 477-494.
- Lee, P.G., Turk, P.E., Forsythe, J.W., DiMarco, F.P. 1998. Cephalopod culture: physiological, behavioral and environmental requirements. *Suisan Zoshoku*, 46, 417-422.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238, 1-37.
- Löffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H., Einsele, H. 1997. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3311-3312.
- Longmire, J.L., Maltbie, M., Baker, R.J. 1997. Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implications for museum collections. *Occasional Papers*, The Museum of Texas Tech University, 163, 1-3.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639-655.

- Maudet, C., Luikart, G., Dubray, D., Von Hardenberg, A., Taberlet, P. 2004. Low genotyping error rates in wild ungulate faeces sampled in winter. *Molecular Ecology Notes*, 4, 772-775.
- Miller, C.R., Joyce, P., Waits, L.P. 2002. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160, 357-366.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
- Mrakovcic, M., Haley, L.E. 1979. Inbreeding depression in the Zebra fish *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan). *Journal of Fish Biology*, 15, 323-327.
- Murphy, J.M., Balguerías, E., Key, L.N., Boyle, P.R. 2002. Microsatellite DNA markers discriminate between two *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda) fisheries along the northwest African coast. *Bulletin of Marine Science*, 71, 545-553.
- Nakadate, M., Shikano, T., Taniguchi, N. 2003. Inbreeding depression and heterosis in various quantitative traits of the guppy, *poecilia reticulata*. *Aquaculture*, 220, 219-226.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. *Columbia University Press*: New York, 512p.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1-10.
- Nietfeldt, J.W., Ballinger, R.E. 1989. A new method for storing animal tissues prior to mtDNA extraction. *Biotechniques*, 7, 31-32.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180, 247-264.
- O'Connell, M., Wright, J.M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7, 331-363.
- Paetkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA based population inventories. *Molecular Ecology*, 12, 1375-1387.
- Pascual, E. 1978. Crecimiento y alimentación de tres generaciones de *Sepia officinalis* en cultivo. *Investigacion Pesquera*, 42, 421-442.
- Pemberton, J.M. 2009. Wild pedigrees: the way forward. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 275, 613-621.

- Pérez-Losada, M., Guerra, A., Carvalho, G.R., Sanjuan, A., Shaw, P.W. 2002. Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity*, 89, 417-424.
- Pérez-Losada, M., Nolte, J.M., Crandall, K.A., Shaw, P.W. 2007. Testing hypotheses of population structuring in the Northeast Atlantic Ocean and Mediterranean Sea using the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Molecular Ecology*, 16, 2667-2679.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P. 2005. Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6, 847-859.
- Porta, J., Porta, J.M., Martínez-Rodríguez, G., Alvarez, M.C. 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, 251, 46-55.
- Pruett, C.I., Winker, K. 2005. Northwestern song sparrow populations show genetic effects of sequential colonization. *Molecular Ecology*, 14, 1421–1434.
- Ralls, K., Ballou, J. 1983. Extinction: lessons from zoos. In Schonewald-Cox, C.M., Chambers, S.M., MacBryde, B., Thomas, L., ed Genetics and Conservation. *Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings*, 164-184.
- Reed, D.H., Briscoe, D.A., Frankham, R. 2002. Inbreeding and extinction: The effect of environmental stress and lineage. *Conservation Genetics*, 3, 301-307.
- Richard, A. 1971. Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode). Thèse 248, Université. Lille, 264p.
- Rivero, E.R.C., Neves, A.C., Silva-Valenzuela, M.G., Sousa, S.O.M., Nunes, F.D. 2006. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology – Research and Practice*, 202, 523-529.
- Ruíz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J., Montero, P. 2002. Characterization of non-protein nitrogen in the Cephalopods volafor (*Illex coindetii*), pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). *Food Chemistry*, 76, 165-172.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Volume 1, Third Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, 800p
- Sel, G.P., Daguzan, J. 1997. A note on sex ratio, length and diet of population of cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) sampled by three fishing methods. *Fisheries Research*, 32, 191-195.

- Seutin, G., White, B.N., Boag, P.T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 82-90.
- Shaw, P.W., Pérez-Losada, M. 2000. Polymorphic microsatellites in the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Molecular Ecology*, 9, 237-244.
- Sibley, C.G., Ahlquist, J.E. 1981. Instructions for specimen preservation for DNA extraction: A valuable source of data for systematics. *Association of Systematic Collections Newsletter*, 9, 44-45.
- Simmons, M., Mickett, K., Kucuktas, H., Li, P., Dunham, R., Liu, Z. 2006. Comparison of domestic and wild channel catfish (*Ictalurus punctatus*) populations provides no evidence for genetic impact. *Aquaculture*, 252, 133-146.
- Skaala, O., Hoyheim, B., Glover, K., Dahle, G. 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. *Aquaculture*, 240, 131-143.
- Spielman, D., Brook, B.W., Frankham, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15261-15264.
- Söller, R., Warnke, K., Saint-Paul, U., Blohm, D. 2000. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Marine Biology*, 136, 29-35.
- Sykes, A.V., Domingues, P.M., Andrade, J.P. 2006b. Effects of using live grass shrimp (*Palaemonetes varians*) as the only source of food for the culture of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture International*, 14, 551-568.
- Sykes, A.V., Domingues, P.M., Correia, M., Andrade, J.P. 2006a. Cuttlefish culture – state of the art and future trends. *Vie et Milieu – Life & Environment*, 56, 129-137.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., Bouvet, J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24, 3189-3194.
- Taberlet, P., Luikart, G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 41-55.
- Taborsky, M. 1994. Sneakers, satellites, and helpers: parasitic and cooperative behaviour in fish reproduction. *Advances in the Study of Behavior*, 23, 1-100.

- Taborsky, M. 2001. The evolution of bourgeois, parasitic, and cooperative reproductive behaviors in fishes. *Journal of Heredity*, 92, 100-110.
- Tait, R.W. 1986. Aspects physiologiques de la senescence post-reproductive chez *Octopus vulgaris*. Thèse de Doctorat, Université Paris, 250p.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463-6471.
- Thai, B.T., Burrige, C.P., Austin, C.M. 2007. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture*, 269, 174-186.
- Valière, N. 2002. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2, 377-379.
- Vallone, P.M., Butler, J.M. 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, 37, 226-231.
- Vandeputte, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M. 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Molecular Ecology Notes*, 6, 265-267.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-513.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Wells, M. 1990. The dilemma of the jet set. *New Scientist*, 125, 44-49.
- Wolfram, K., Mark, F.C., John, U., Lucassen, M., Pörtner, H.O. 2006. Microsatellite DNA variation indicates low levels of genetic differentiation among cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) populations in the English Channel and the Bay of Biscay. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part D 1, 375-383.
- Xu, J., Turner, A., Little, J., Bleecker, E.R., Meyers, D.A. 2002. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Human Genetics*, 111, 573-574.
- Zane, L., Nelson, W.S., Jones, A.G., Avise, J.C. 1999. Microsatellite assessment of multiple paternity in natural populations of a live-bearing fish, *Gambusia holbrooki*. *Journal of Evolutionary Biology*, 12, 61-69.