

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E DO AMBIENTE

**CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DO LINGUADO DO
SENEGAL, *Solea senegalensis* (KAUP 1858), EM
AQUACULTURA**

MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA

Céline Rodrigues Madeira

FARO

2008

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS DO MAR E DO AMBIENTE

**CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DO LINGUADO DO
SENEGAL, *Solea senegalensis* (KAUP 1858), EM
AQUACULTURA**

MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA

Céline Rodrigues Madeira

FARO

2008

NOME: Céline Rodrigues Madeira

DEPARTAMENTO: Centro de Ciências do Mar

ORIENTADORES: Prof. Doutora M^a. Leonor Cancela
Doutora Sara Mira

DATA: Faro, 12 Setembro 2008

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DO
LINGUADO DO SENEGAL, *Solea senegalensis* (KAUP 1858), EM
AQUACULTURA

Agradecimentos

Começo por agradecer à Prof. Doutora Leonor Cancela e à Doutora Sara Mira, pela confiança e oportunidade de realizar este estudo, assim como a orientação do mesmo.

À equipa de aquacultura do *S. senegalensis* pela cedência das amostras e principalmente à Patrícia pelas explicações e boa vontade.

Agradeço a todo o pessoal do laboratório 2.51 da FCMA, principalmente ao Nelson, Licínia, Tânia e Xana, por todo o apoio e ajudas ao longo deste trabalho.

Ao meu companheiro de bancada e amigo, Davide, pelas risadas que demos e pelo que conseguimos aprender com muito empenho.

Ao pessoal do laboratório 2.13 da FCMA que me ajudaram a encontrar o material que procurava, e principalmente à Marta e à Cátia pelas palavras matinais de “ em quantos PCR´s já vais?”

Aos meus pais, Álvaro e Zulmira, pelo seu apoio incondicional e conselhos nos momentos mais difíceis.

À minha irmã, Corina.

A todos os meus amigos que acompanharam o meu trabalho e que sempre me apoiaram.

Obrigada a todos...

Abstrat

Since the early 80's Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) has been a potential target for intensive cultivation in Southern Europe, due to its high economic value. However, there are still some limitations in particular those related to the existing difficulties in controlling reproduction in captivity. In aquaculture, managing the number of required breeding individuals is important to produce viable and variable offspring to ensure its survival, avoiding high levels of consanguinity and its deleterious effects. From an economic standpoint it is also essential to ensure that breeding individuals contribute efficiently to a viable offspring.

In this study, the contribution of each of 10 adult individuals to the offspring was analysed by testing approximately 25 eggs per posture daily. Samples of postures were daily collected between March and May 2007. After DNA extraction, the paternity of individual eggs was determined using 7 microsatellites *loci* (SSeGATA38, SolMII, SolCA13, Sol13D, Sol5D, SolGA12, SseCA39). The set of 7 microsatellites *loci* analyzed has a high probability of exclusion thus making them indispensable tools in the allocation of paternidades. However, the high percentage of genotyping errors due to the presence of null alleles can be a problem. This study demonstrated a clear dominance from a couple of progenitors throughout the entire reproduction season. The results obtained showed the usefulness of this methodology to characterise the groups of effective breeders in this species.

Keywords: *Solea senegalensis*; Microsatellites; Paternity; Aquaculture;

Resumo

Desde os anos 80, que o linguado do Senegal (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) tem sido um potencial alvo para o cultivo intensivo no Sul da Europa, devido ao seu importante valor económico. No entanto, existem ainda algumas limitações, nomeadamente no que se refere ao baixo controlo reprodutivo em cativeiro. Em aquacultura, controlar o número de reprodutores necessários é importante para a produção de uma descendência viável e variável de modo a assegurar a sua sobrevivência, evitando elevados níveis de consanguinidade e os seus efeitos deletérios. Do ponto de vista económico, é também indispensável garantir que os reprodutores contribuam para a formação da descendência.

Neste estudo, utilizou-se um grupo de 10 reprodutores e analisaram-se aproximadamente 25 ovos de cada postura diária efectuada entre os meses de Março e Maio de 2007. Para a determinação da paternidade utilizaram-se 7 *loci* microssatélites (SSeGATA38, Sol MII, Sol CA13, Sol 13D, Sol 5D, Sol GA12, SseCA39). O conjunto dos 7 *loci* microssatélites analisados apresenta uma elevada probabilidade de exclusão tornando-os ferramentas indispensáveis na atribuição de paternidades. Contudo, a elevada percentagem de erros de genotipagem devido à presença de alelos nulos pode tornar-se preocupante. Este estudo demonstra a existência da dominância de um par de progenitores ao longo de toda a época reprodutiva. Os resultados obtidos permitem propor novas abordagens no que se refere à caracterização dos grupos de reprodução nesta espécie.

Palavras-Chave: *Solea senegalensis*; Microssatélites; Paternidade; Aquacultura;

Índice

- 1. INTRODUÇÃO**
- 2. METODOLOGIAS UTILIZADAS**
 - 2.1. MODELO BIOLÓGICO**
 - 2.2. DESENHO EXPERIMENTAL**
 - 2.3. ANÁLISE GENÉTICA**
 - 2.3.1. EXTRACÇÃO DE ADN**
 - 2.3.1.1. INDIVÍDUOS PROGENITORES**
 - 2.3.1.2. INDIVÍDUOS DESCENDENTES**
 - 2.3.2. QUANTIFICAÇÃO DE ADN**
 - 2.3.3. AMPLIFICAÇÃO POR REACÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**
 - 2.3.4. GENOTIPAGEM**
 - 2.3.5. ANÁLISE DE PATERNIDADES E OUTROS PARÂMETROS**
 - 2.3.5.1. ESTIMAÇÃO DE ERROS DE GENOTIPAGEM**
 - 2.3.5.2. ANÁLISE DE PATERNIDADES**
- 3. RESULTADOS**
 - 3.1. EXTRACÇÃO DE ADN**
 - 3.2. ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES E ERROS DE GENOTIPAGEM**
 - 3.3. ANÁLISE DE PATERNIDADES**
- 4. DISCUSSÃO**
 - 4.1. EXTRACÇÃO DE ADN**
 - 4.2. ERROS DE GENOTIPAGEM**
 - 4.3. ANÁLISE DE PATERNIDADES**
- 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**
- 6. PERSPECTIVAS FUTURAS**
- 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
- 8. ANEXO**

1. Introdução

A elevada procura de produtos pesqueiros e o melhoramento tecnológico tem levado a um aumento do esforço de pesca sobre as populações naturais e como consequência, o colapso de muitos stocks de inúmeras espécies. Esta evidência potenciou o desenvolvimento da prática de aquacultura que tem contribuído beneficentemente para a demanda do Homem, quer a nível económico e social, quer a nível ambiental pela redução do esforço de pesca e a consequente contribuição para um aumento natural dos stocks selvagens ou através de programas de repovoamento de algumas populações selvagens (Martínez, 2005).

Uma das limitações em aquacultura é a incapacidade de produzir todas as espécies devido ao desconhecimento de condições biológicas e/ou comportamentais destas, assim como a perda da variabilidade genética e o aumento da consanguinidade ao longo do tempo pela descendência, e consequentemente a diminuição da resistência a doenças e da capacidade de adaptação a alterações ambientais (Borrell *et al.*, 2004; Frost *et al.*, 2006; Sekino *et al.*, 2003; Thanh Tai *et al.*, 2007).

Todos os organismos estão sujeitos a mutações como resultado de processos celulares normais ou interações ambientais (Lui & Cordes, 2004). Uma elevada diversidade genética, tanto intra- como inter-populacional (Martínez, 2005), é fundamental visto que o melhoramento genético permite uma maximização da eficiência da produção e dos programas de selecção (Castro *et al.*, 2006; Ohara *et al.*, 2005).

A descoberta de técnicas moleculares utilizando marcadores, como os microssatélites, teve um papel fundamental no estudo da evolução, conservação e ecologia ambiental (Hughes, 1998; Oliveira *et al.*, 2006). Os microssatélites ou repetições de sequências simples (SSRs), de 2 a 6 pares de bases (*bp*), são marcadores moleculares co-dominantes, multialélicos (Chistiakov *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Schlötterer, 1998) e amplamente distribuídos ao longo do genoma eucariótico e procariótico (Mrázek *et al.*, 2007; Schlötterer, 1998; Zane *et al.*, 2002). Estão presentes em regiões codantes e não codantes dos genes e são caracterizados pelo seu elevado nível de polimorfismo, contribuindo para a elevada variabilidade das espécies e das populações (Beuzen *et al.*, 2000; Chistiakov *et al.*, 2006; Zane *et al.*, 2002). Ao longo do genoma, cerca de 30 a 67% dos microssatélites encontrados são compostos por repetições de dinucleótidos encontrando-se com menor frequência as repetições de tri e a hexanucleótidos (Chistiakov *et al.*, 2006; Schlötterer, 1998). Apresentam uma taxa de

mutação de 10^{-6} a 10^{-2} *per Locus e per geração* (Oliveira *et al.*, 2006; Small *et al.*, 1998) sendo esta dependente do tamanho do microssatélite (Yamada *et al.*, 2002). Apesar de ser uma ferramenta bastante utilizada, a origem do elevado grau de polimorfismo não se encontra clarificada. Existem vários mecanismos para explicar o que leva à perda/ganho de unidades de repetição do microssatélite (Bachtrong *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006; Tazou, 1989) incluindo erros na recombinação, *crossing-over* desigual e *slippage* da enzima Polimerase durante a replicação ou reparação do ADN (Bachtrong *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006; Schlötterer, 1998). Sendo este último o mais aceite pelos investigadores pelo facto de ser suportado por experiências *in vitro* e apresentar uma maior consistência em estudos de populações (Oliveira *et al.*, 2006). O desenvolvimento de vários modelos matemáticos, com base em processos mutacionais, permitiu a pressuposição do número de alelos heterozigóticas observados numa população (Oliveira *et al.*, 2006). Existem vários modelos desenvolvidos para descrever a evolução dos microssatélites: (i) o mais popular é o modelo de mutação de *stepwise* (*SMM*) de Kimura & Ohta (1978), em que cada mutação adiciona ou elimina somente uma unidade de repetição ao alelo (Jarne & Lagoda, 1996; Oliveira *et al.*, 2006), (ii) outro dos modelos é o de Alelos Infinitos (*IAM*) descrito por Kimura & Crow (1964) em que qualquer alelo tem igual probabilidade de ocorrer (Jarne & Lagoda, 1996; Oliveira *et al.*, 2006), (iii) existe ainda o modelo de Alelos K (*KAM*) proposto por Crow & Kimura (1970), o qual assume a existência exacta de K estados alélicos possíveis, com uma probabilidade de mutação constante para qualquer outro alelo existente, e finalmente, (iv) o modelo de Duas Fases (*TPM*), descrito por Di-Rienzo *et al.*, (1994) em que eventos mutacionais alteram a extensão do alelo em uma unidade de repetição e a ocorrência de *crossing-over* desigual possibilita a formação de alelos com diferenças em mais do que uma unidade de repetição.

Para obter o genótipo de um determinado *locus* de microssatélite, estes marcadores podem ser facilmente amplificados através de uma reacção em cadeia da Polimerase (*PCR*) com o auxílio de sequências específicas de flanqueamento, os *primers* (Beuzen *et al.*, 2000; Chistiakov *et al.*, 2006; Lui & Cordes, 2004). Após a amplificação do *locus* este pode ser facilmente identificado recorrendo a diversas técnicas de electroforese. Estes marcadores, em conjunto com a técnica de *PCR*, têm sido bastante utilizados em inúmeros estudos, sendo beneficiados com o avanço da técnica de *PCR* multiplex que permite a análise de vários microssatélites em simultâneo numa só reacção (Porta *et al.*, 2006).

Muitos investigadores de diversas áreas têm vindo a interessar-se pelas características e aplicações dos microssatélites sendo estes encarados hoje em dia como uma ferramenta indispensável para (i) estudos de mapeamento genético (*e.g.* Ning *et al.*, 2007; Ohara *et al.*, 2005) devido à sua elevada informação dada pelo seu grau de polimorfismo (Chistiakov *et al.*, 2006; Lui & Cordes, 2004), (ii) estudos forenses, MacAvoy *et al.* (2008) e Renshaw *et al.* (2006), onde são usados para a identificação de indivíduos, por apresentarem uma grande estabilidade em ADN degradado devido ao seu pequeno tamanho (Chistiakov *et al.*, 2006), (iii) atribuição de ancestrais e nos estudos de evolução onde, devido à sua variabilidade, permitem a determinação de relações filogenéticas entre indivíduos (*e.g.* Malone *et al.*, 2000), (iv) aplicações filogeográficas e na determinação de estruturas populacionais e diferentes escalas geográficas, como nos estudos de Kasapidis & Magoulas (2008) e Pérez-Portela & Turon (2008), e (v) estudos de conservação através da análise de consanguinidade, estrutura genética e adaptações (Chistiakov *et al.*, 2006). O elevado sucesso dos microssatélites em estudos como identificação de relações parentais e na obtenção de informação sobre o *fitness* (*e.g.* Dong *et al.*, 2006; Jerry *et al.*, 2004; Jerry *et al.*, 2006), comparação entre populações naturais e cultivadas (*e.g.* Funes *et al.*, 2004; Jones & Ardren, 2003), estimação de relações entre potenciais pares de acasalamento (*e.g.* Norris *et al.*, 2000; Renshaw *et al.*, 2006; Jones & Ardren, 2003), avaliação da diversidade e manutenção dos stocks (*e.g.* Jackson *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Poteaux *et al.*, 1999; Thanh Tai *et al.*, 2007) e na obtenção de informações sobre os pedigrees da população (*e.g.* Castro *et al.*, 2004) têm beneficiado as áreas da pesca e da aquacultura onde a diferenciação genética entre as populações é limitada.

Os recursos genéticos nas populações naturais constituem um suporte essencial para a Aquacultura, nomeadamente os estudos de paternidade, visto que através destes poderá ocorrer a formação de novos stocks de reprodutores e o desenvolvimento de programas de selecção genética. São igualmente indispensáveis em espécies de postura natural, como *Solea senegalensis*, onde existe a impossibilidade de planear os cruzamentos (Martínez, 2005; Dinis *et al.*, 1999).

Desde os anos 80 que a reprodução de *S. senegalensis* em cativeiro tem sido objecto de estudo (Dinis, 1992; Marques *et al.*, 2006), pelo facto de este peixe apresentar um elevado valor comercial, um rápido desenvolvimento dos ovos e das larvas, e uma elevada taxa de crescimento dos juvenis. Estas características fazem desta espécie um alvo potencial para a utilização em aquacultura intensiva, sendo actualmente

cultivados em Portugal e Espanha em sistema extensivo (Dinis *et al.*, 1999; Funes *et al.*, 2004). Nesta como noutras espécies, a reprodução em cativeiro depende de inúmeros factores ambientais e apresenta algumas limitações, nomeadamente no que se refere ao baixo controlo reprodutivo (Cabrita *et al.*, 2006), surgindo muitas vezes a necessidade da indução da maturação e ovulação, através de hormonas ou alteração das condições de cultivo, assim como a temperatura da água (Dinis *et al.*, 1999). Apesar de existir pouca informação sobre a produção e qualidade dos gâmetas de *S. senegalensis*, a maioria dos problemas são atribuídos às fêmeas devido à sua baixa produção e à qualidade dos oócitos (Cabrita *et al.*, 2006). No entanto, nos últimos anos tem-se vindo a verificar um aumento do êxito da reprodução e da produção de elevadas densidades de ovos viáveis e larvas em sistema fechado (Dinis *et al.*, 1999).

A diversidade genética de stocks comerciais de *S. senegalensis* tem sido reportada pelos estudos elaborados por Porta *et al.* (2006) através do acompanhamento da performance de um stock em cativeiro, com o objectivo de avaliar a variabilidade e relações genéticas entre os indivíduos. No entanto, ainda existe pouca informação sobre a estrutura genética e variabilidade entre populações naturais e cultivadas (Castro *et al.*, 2006; Funes *et al.*, 2004).

Com este estudo, pretende-se determinar a contribuição de reprodutores de *S. senegalensis* para a descendência, utilizando um só tanque reprodutivo com igual *sex-ratio*, ao longo de uma época de reprodução. E recorrer à análise de marcadores microssatélites para elaborar testes de paternidade das amostras recolhidas diariamente ao longo do período de posturas de um grupo de progenitores em cativeiro, de forma a reconstruir padrões parentais. Através da reconstrução de padrões parentais pretende-se obter informações sobre a diversidade genética do stock e da descendência, determinar diferentes contribuições dos progenitores para a descendência e determinar o *fitness* dos progenitores utilizando ovos viáveis e inviáveis.

2. Metodologias utilizadas

2.1. Modelo Biológico

O linguado do Senegal (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) pertence à ordem Pleuronectiformes e ocorre em águas subtropicais e temperadas do Oceano Atlântico Este e Mar Mediterrâneo (Imslund *et al.*, 2003). A maturação das fêmeas ocorre aos 3 anos de idade quando atingem um comprimento total de 32 cm e produzem cerca de 500 oócitos /grama de peixe (Dinis *et al.*, 1999). A época de reprodução desta espécie é

muito variável e tem em geral dois períodos anuais, de Janeiro a Junho e de Outubro a Novembro (García-Lopez *et al.*, 2006).

2.2. Desenho experimental

O processo de cultivo, tratamento e recolha das amostras analisadas neste estudo foram efectuados pelo grupo de aquacultura.

A amostragem foi efectuada diariamente (de acordo com as posturas dos progenitores) e consistiu na recolha de ovos viáveis (figura 1) e ovos inviáveis (figuras 2), estes últimos podendo ser não fecundados (figura 2a) ou abortados (figura 2b). A diferenciação é feita através do método de decantação tendo em conta a sua flutuabilidade pois os ovos viáveis flutuam enquanto que os ovos inviáveis se depositam no fundo. Posteriormente os ovos recolhidos foram preservados em etanol a 96% até ao seu processamento em laboratório.

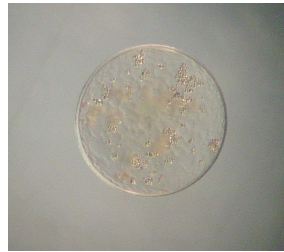


Figura 1- Ovo viável

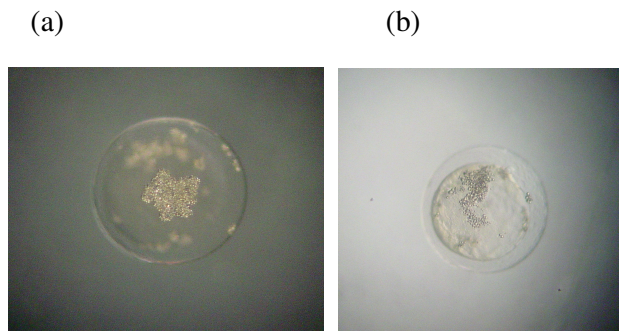


Figura 2 – Ovos inviáveis, ovo não fecundado (painel a) e ovo abortado (painel b).

2.3. Análise genética

2.3.1. Extração de ADN

O método de extração de ADN dos indivíduos analisados nesta experiência consistiu na libertação de ácidos nucleicos após a digestão das células eucarióticas ou

tecidos com a enzima Proteinase K em EDTA (solução que sequestra cátions bivalentes e inibe a acção das enzimas DNAses), o que solubiliza as membranas desnaturando as proteínas na presença de SDS, como detergente. Este método permite a desnaturação das proteínas através de uma solução altamente salina, favorecendo a agregação destas e de outros contaminantes aumentando assim o seu peso molecular e permitindo a sua precipitação e posterior eliminação (Sambrook & Russell, 2001).

2.3.1.1. Indivíduos progenitores

Foram recolhidas amostras de sangue dos progenitores através da veia caudal com seringas esterilizadas. As amostras obtidas foram colocadas em microtubos de 1,5mL, devidamente identificados. Após a colheita centrifugou-se durante 5 minutos a 14000rpm para a separação do plasma (utilizado para outras análises) e dos eritrócitos. O método de extracção de ADN foi adaptado do protocolo descrito por Turtinen & Juran (1997). Ao precipitado constituído por células sanguíneas, adicionou-se cerca de 1mL de tampão de lise (10mM de Tris-HCl a pH 8; 1mM de EDTA; 1mM de NaCl e 1% de SDS) e preservaram-se as amostras a uma temperatura de 4°C até serem processadas. Posteriormente, num novo microtubo de 1,5mL colocou-se cerca de 50µL de amostra de sangue de cada indivíduo. Adicionaram-se 400µL de tampão de lise e 30µL de enzima Proteinase K (20mg/mL), tendo-se de seguida homogeneizado a solução e incubado a uma temperatura de 55°C com agitação moderada, até que as células se encontrassem completamente lisadas, cerca de 16 horas (digestão nocturna). Após o tempo de digestão, adicionaram-se 200µL de solução de NaCl saturada (~ 6M) e homogeneizou-se em vortex durante 20 segundos. Colocou-se em seguida a incubar no gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se durante 20 minutos a 14000rpm a 4°C e recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5mL. Adicionou-se 1Vol de isopropanol frio homogeneizando bem a solução. Precipitou-se o ADN a -20°C durante 30 minutos. Seguidamente, centrifugou-se durante 15 minutos a 14000 rpm e removeu-se o sobrenadante. Procedeu-se à lavagem do precipitado com 800µL de etanol 70% e posterior centrifugação durante 10 minutos a 14000rpm. Eliminou-se o etanol e o precipitado secou à temperatura ambiente. Eluiu-se o ADN em 200µL de água ultrapura.

2.3.1.2. Indivíduos descendentes

A extracção de ADN dos ovos foi adaptada do protocolo 6, descrito por Sambrook & Russell (2001). Para isso colocou-se um ovo num microtubo de 1,5mL, devidamente identificado, adicionaram-se 100µL de solução de tampão de extracção (10mM de Tris pH 8; 1mM de EDTA pH 8; 0,1% (w/v) de SDS), e 2µL de enzima Proteinase K (20mg/mL), seguindo de homogeneização e incubação a 55° C durante 2 horas. Após a digestão adicionaram-se 30µL de solução de acetato de potássio (60mL de acetato de potássio a 5M; 11,5mL de ácido acético glacial e 28,5mL de água ultrapura) e homogeneizou-se em vortex durante 20segundos. Seguidamente, centrifugou-se durante 5 minutos a 14000rpm a 4°C, transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5mL, devidamente identificado. Adicionaram-se 100µL de isopropanol frio e homogeneizou-se por inversão. Precipitou-se o ADN a -20°C durante 1 hora e centrifugou-se durante 10 minutos a 14000rpm a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 100µL de etanol a 70%. Centrifugou-se durante 5 minutos a 14000rpm a 4°C. Posteriormente, removeu-se o etanol e secou-se o precipitado da amostra à temperatura ambiente. Eluiu-se o ADN em 20µL de água ultrapura.

2.3.2. Quantificação de ADN

O ADN extraído foi verificado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo uma solução de brometo de etídio, que ao intercalar-se com os nucleótidos da sequência de ADN permite uma fácil observação, pela emissão de fluorescência quando visualizado com o auxílio de lâmpadas UV. Utilizou-se cerca de 3µl de amostra e 1µl de tampão de migração (azul bromofenol e xileno de cianol em 30% glicerol) e comparou-se a intensidade da fluorescência com um marcador de peso molecular de ADN (λ EcoRI + Hind III, 20ng/µL).

2.3.3. Amplificação por reacções em cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi desenvolvida em 1985, por Kary Mullis, na área de biologia molecular e revolucionou a investigação genética. A reacção de PCR tem como objectivo a produção de grandes quantidades de um segmento específico de ADN de forma rápida e eficaz *in vitro*, a partir de uma quantidade mínima, através da amplificação controlada pela enzima Polimerase *Taq* (isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*) (Laudenbach *et al.*, 1999).

Inicialmente foram otimizados e utilizados para a caracterização do genótipo de cada indivíduo 10 microssatélites/*loci* (Tabela 1). Após a constatação da inexistência de ADN suficiente nas amostras dos descendentes para uma análise com 10 *loci* utilizaram-se somente 7 *loci* microssatélites (2 *PCR multiplex*), excluindo os *loci* SseCA28, SseGATA26 e SseGATA67. A exclusão destes *loci* foi de acordo com a diferença nas temperaturas de hibridação apresentadas pelos mesmos, em que na sua utilização levaria a um maior gasto de ADN (SseCA28, SseGATA26) ou à baixa eficiência do *locus* (SseGATA26).

Cada reacção de *PCR*, efectuada num volume final de 10 μ L, utilizou 1x de tampão de reacção, 0,2mM de dNTP's, 2mM de $MgCl_2$, 0,2 a 0,4 μ M dos *primers Forward* e *Revers* (Tabela 1), 0,5 unidades da enzima *Taq* (Invitrogen), 3 e 5 μ L ADN proveniente da extracção dos ovos e sangue, respectivamente.

Como ilustra a figura 3, o programa da reacção de *PCR* optimizado é iniciado por um passo de desnaturação do ADN, onde ocorre a quebra das ligações da cadeia dupla e a sua separação por aquecimento da amostra a 94° C durante 8 minutos, seguido de dois programas de três etapas cíclicas: desnaturação a 94° C; hibridação dos *primers* complementares dependendo da sua temperatura óptima; e síntese da nova cadeia a uma temperatura de 72°C, correspondendo à temperatura óptima de funcionamento da enzima *Taq*. Por fim, uma etapa final de extensão a 72°C, durante 12 minutos.

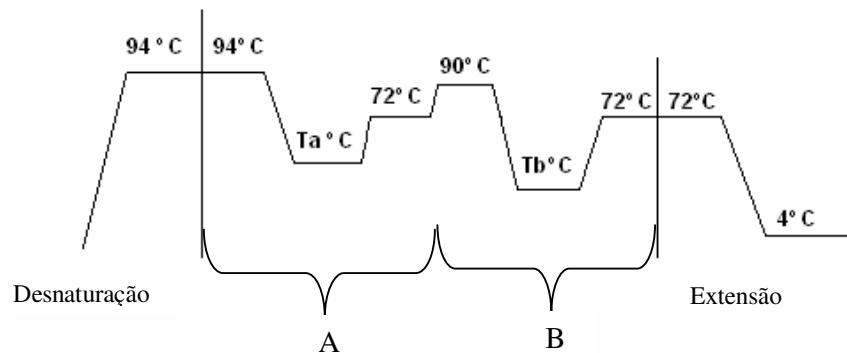


Figura 3 – Representação esquemática de uma reacção em cadeia da polimerase (*PCR*). Em que T_a °C e T_b °C representam temperaturas de hibridação específicas e A, B o número de ciclos.

O número de ciclos foi otimizado dependendo do tipo de amostras a analisar, sendo para os progenitores A= 20 e B= 10, e para as amostras dos descendentes A= 25 e B= 15.

Tabela 1.- Características dos 10 *loci* polimórficos de *Solea senegalensis* (Kaup 1858) utilizados neste estudo. *Locus*, *Primer* (5´-3´) em que For: *forward* e Rev: *reverse*, motivo de repetição, temperatura de hibridação (Ta e Tb °C), quantidade de *primer* (µM) e referência bibliográfica que descreve o *primer*.

<i>Locus</i>	<i>Primer</i> (5´- 3´)	<i>Motivo</i>	<i>Temperatura de hibridação</i>		<i>Quantidade de Primer</i> (µM)	<i>Referência</i>
			Ta ° C	Tb ° C		
SseCA39	For:Ned TCTCTTTATCTTCCAGCGCGGTGCTTA	(CA) ₁₃	65	60	0,2	Funes <i>et al.</i> , 2004
	Rev: CGCTGAGACGGATGTTAGGAGGGAAAT				0,2	
SseCA28	For: Vic AGAGACGAGTACACAGGAGGGAAAGTGCAG	(CA) ₁₇	67	62	0,2	Funes <i>et al.</i> , 2004
	Rev: TTTCGCATCCCTGGTGTTCACCTCA				0,2	
SseGATA26	For: Vic GTGTTAGACAGACAGATAGATAGCTGTTAGCA	(GATA) ₁₂	60	55	0,3	Funes <i>et al.</i> , 2004
	Rev: TGTAATGTAAATCTCTCTGACTGTAGTTTCAC				0,4	
SseGATA67	For: Vic GGGGAAGGTGGGATAAATGGATGATTGA	(GATA) ₁₇	65	60	0,2	Funes <i>et al.</i> , 2004
	Rev: GCTGATTACAAACACCGCCCTGGAAAG				0,2	
SseGATA38	For: Fam ATATCATCAGGCAGTAAAACGGTCGCAAATG	(GATA) ₂₀	65	60	0,2	Funes <i>et al.</i> , 2004
	Rev: GCAATCTGCAAACCTGACCACTAGATGCCAGT				0,2	
Sol 5D	For: Fam GGGGATTTGAAGACATGTGG	(CA) ₁₈	57	53	0,3	Porta & Alvarez, 2004
	Rev: TTTCAGCCTTTCAGGTTTGC				0,4	
Sol MII	For: Pet TTCAAAGCAGTCGTCCTCAGG	(CTG) ₁₀	65	60	0,2	Porta & Alvarez, 2004
	Rev: ACGAGGTAGGTGGAAAGCTGC				0,2	
Sol 13D	For: Ned GATCATTAGAGAGGTCACACGAGC	(GT) ₁₂	57	53	0,2	Porta & Alvarez, 2004
	Rev: CATGACATCATCGCAGACC				0,2	
Sol CA13	For: Pet AAGGCAGATGTCGATCACTGC	(GAA) ₁₀	57	53	0,2	Porta & Alvarez, 2004
	Rev: TGAACAACGCCTAGAATTAGC				0,2	
Sol GA12	For: Fam GATCCGCTTGGGGTGAGG	(GA) ₁₉	57	53	0,3	Porta & Alvarez, 2004
	Rev: TGCCATACTTCACTTGTTCCG				0,4	

2.3.4. Genotipagem

Para a determinação dos tamanhos dos alelos adicionou-se 9,5µL de solução de migração da amostra (9,25µL de formamida e 0,25µL de marcador molecular GeneScan™ 500Liz®) a µL do produto de *PCR*. As amostras foram desnaturadas a 94°C durante 5 minutos e submetidas a eletroforese em sequenciador automático Genetic Analyzer 3130XL de 16 capilares (Applied BioSystems). Os resultados foram visualizados e analisados com o auxílio do programa STRand 2.3.79 (Veterinary Genetics Lab).

Depois de analisados os resultados utilizou-se MsatAllele 1.0, pacote de interface R para a exportação dos dados (Alberto, (2008) programa disponível em <http://www.ccmr.ualg.pt/maree/software.php?soft=msatalle>).

2.4. Análise de paternidades e outros parâmetros

2.4.1 Estimação de erros de genotipagem

Os erros de genotipagem são normalmente identificados quando existem algumas incompatibilidades alélicas entre a descendência e os progenitores (Bonin *et al.*, 2004; Cercueil *et al.*, 2002). Poderão ser causados (i) durante a amostragem e extracção de ADN (quando a qualidade e a quantidade de ADN é baixa poderá causar falhas na amplificação de um alelo) (Hoffman & Amos, 2005), (ii) pela técnica de genotipagem utilizada, incluindo a não amplificação de um alelo contribuindo para a identificação de um indivíduo como homozigótico, quando ele é heterozigóticos, (iii) presença de artefactos amplificados ou quando ocorre a adição de um novo alelo devido à *slippage* da enzima Polimerase que produz uma amplificação diferencial ou (iv) por causas humanas (contaminações) (Bonin *et al.*, 2004; Hoffman & Amos, 2005).

As mutações e os erros de genotipagem têm sido identificadas como causadores da redução do poder da atribuição de paternidades, nomeadamente a presença de alelos nulos (Vandeputte *et al.*, 2006) que mesmo em frequências moderadas (superiores a 0.05 (Martínez, 2005)) poderão comprometer a análise (Castro *et al.*, 2004). Os alelos nulos são alelos que frequentemente não amplificam possivelmente devido à baixa qualidade e/ou quantidade de ADN ou podem resultar da existência de polimorfismos nas regiões de ligação dos *primers*. A sua origem poderá ser facilmente identificadas através da sequenciação das zonas de ligação (Callen *et al.*, 1993; Chapuis & Estoup, 2007; Dakin & Avise, 2004), enquanto que os alelos falsos têm origem em mutações ou são consequência de contaminações durante os procedimentos laboratoriais. Estas presenças podem ser detectadas pelo défice em heterozigotas que produzem desvios ao

equilíbrio Hardy-Weinberg (Martínez, 2005), assim como pela existência de incompatibilidades quando existe a certeza do genótipo de um dos progenitores na análise.

Os erros de genotipagem poderão deturpar os dados induzindo a falsas estimações das frequências alélicas, influenciando a análise de paternidades. Para a diminuição desse efeito estimou-se a probabilidade de erro de genotipagem repetindo separadamente, $n=5$, a amplificação pela reacção de *PCR* das 10 amostras de progenitores para todos os *loci*. Recorreu-se ao programa GIMLET 1.3.3 (Valière, 2002) para estimar o tipo e a probabilidade dos diferentes erros de genotipagem e construir um genótipo consenso, que foi utilizado na análise de paternidades. O genótipo consenso foi construído através do método de *Threshold* (com valor 2) em que um alelo é aceite caso surja pelo menos duas vezes nos replicados. Quando há mais que dois alelos diferentes mantidos o genótipo é considerado ausente de dados.

2.4.2. Análise de paternidades

Para determinar as frequências alélicas, heterozigotia esperada (H_e) e observada (H_o) utilizou-se o programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Na determinação do par de progenitores mais provável na origem de cada indivíduo da descendência recorreu-se ao programa CERVUS 3.0.3 (Marshall *et al.*, 1998). O método utilizado na atribuição de paternidades é o de exclusão, em que o genótipo dos progenitores é comparado com o dos descendentes, e são excluídos os que não apresentarem semelhanças. Nem sempre este método é eficaz, sobretudo quando são atribuídos inúmeros candidatos não excluídos. O programa calcula a probabilidade de *ratio* LOD (*Likelihood ratio*) que permite distinguir estatisticamente os candidatos não excluídos. Esta é calculada através da razão entre a probabilidade do par candidato ser o verdadeiro e a probabilidade desse par não ser o verdadeiro. Um LOD positivo significa que a probabilidade do par candidato ser o verdadeiro é a mais provável, enquanto que um valor negativo significa que a probabilidade do par em causa ser o verdadeiro candidato é menor que a de um par escolhido ao acaso (Kalinowski *et al.*, 2007). A confiança estatística deste teste é determinada pelo valor delta (diferença entre o LOD do par com maior probabilidade e o LOD do segundo mais provável) (Kalinowski *et al.*, 2007). Na simulação foram consideradas as frequências alélicas dos 10 progenitores (diferenciando 5 fêmeas e 5 machos) com uma amostragem de 100% e 10 000 descendentes. Utilizou-se uma proporção de erro de 0,12 (média das taxas de erro

obtidas com o programa GIMLET) definido que cada amostra contém um mínimo de 4 em 7 *loci* genotipados.

3. Resultados

3.1. Extração de ADN

A extração de ADN nos progenitores apresenta uma taxa de eficiência elevada, como é possível verificar na figura 4.

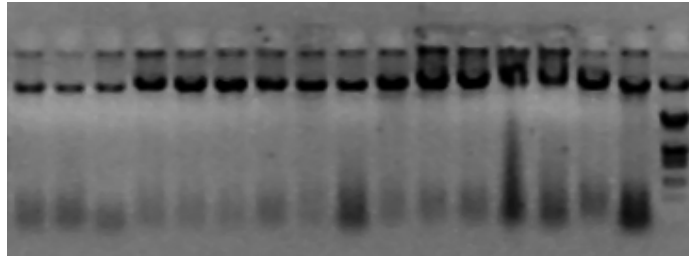


Figura 4 - Electroforese das amostras provenientes da extração de ADN das amostras de sangue dos progenitores. As amostras foram colocadas em gel de agarose de 0,8%. Após submetidas à electroforese o ADN foi revelado pela solução de brometo de etídio. No primeiro poço da direita do gel foi colocado o marcador padrão λ EcoRI + Hind III.

Quanto à extração de ADN dos descendentes deparamo-nos com uma taxa de eficiência do método nos ovos inviáveis muito reduzida, sendo que a maioria das amostras extraídas não apresentam ADN visível aquando da verificação em gel de agarose (Figura 5a) e sem resultado na amplificação por *PCR*. Este resultado levou a que no decorrer do estudo se considerasse apenas as amostras viáveis. Quanto aos ovos viáveis o ADN obtido foi verificado em gel de agarose (Figura 5b), mas devido às baixas concentrações detectadas optou-se pela verificação do produto obtido após a amplificação por *PCR* (Figura 6).

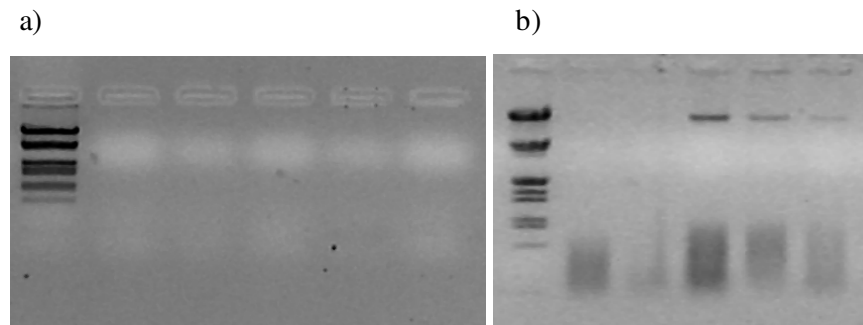


Figura 5 – Electroforese das amostras provenientes da extração de ADN de ovos inviáveis (painel a) e viáveis (painel b). As amostras foram colocadas em gel de agarose de 0,8%. Após submetidas à electroforese o ADN foi revelado pela solução de brometo de etídio. No primeiro poço da esquerda de cada gel foi colocado o marcador padrão λ EcoRI + Hind III.

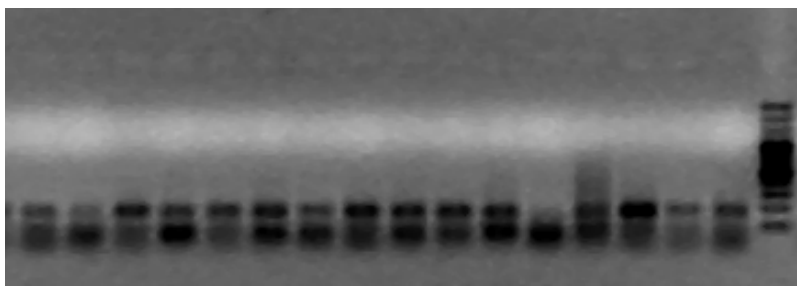


Figura 6 – Electroforese das amostras proveniente da reacção de *PCR* de ovos viáveis. As amostras foram colocadas em gel de agarose de 1,5%. Após submetidas à electroforese o ADN foi revelado pela solução de brometo de etídio. No poço da direita do gel foi colocado o marcador padrão 100bp.

Foram genotipados e analisados um total de 552 indivíduos (10 progenitores e 542 descendentes viáveis). Devido à ausência de amplificação em algumas amostras, o número de ovos efectivamente analisados por dia de amostragem variou entre 20 a 26 (Figura 7).

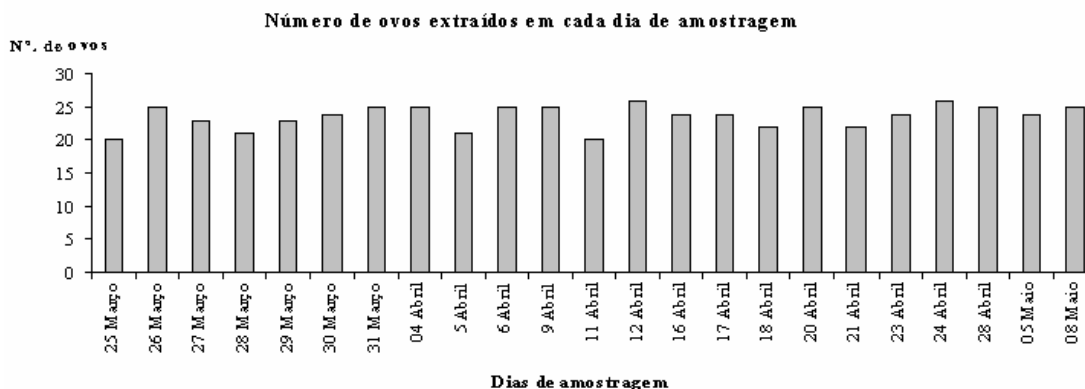
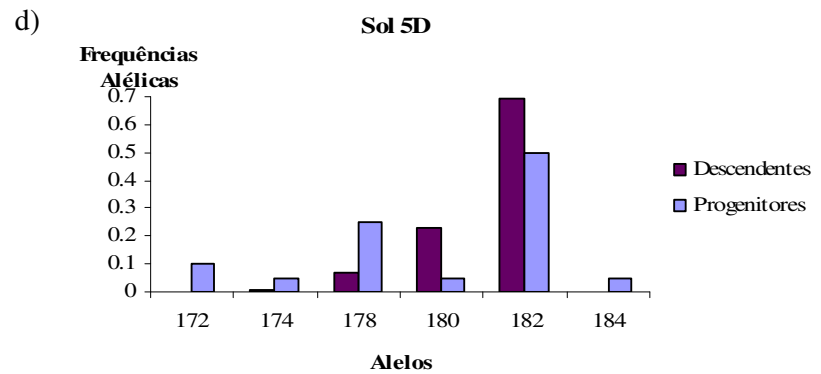
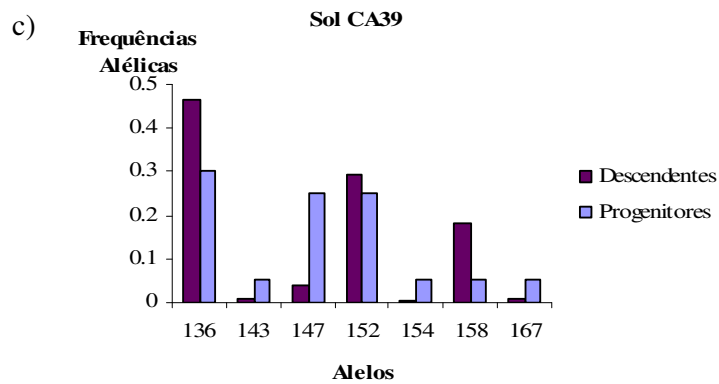
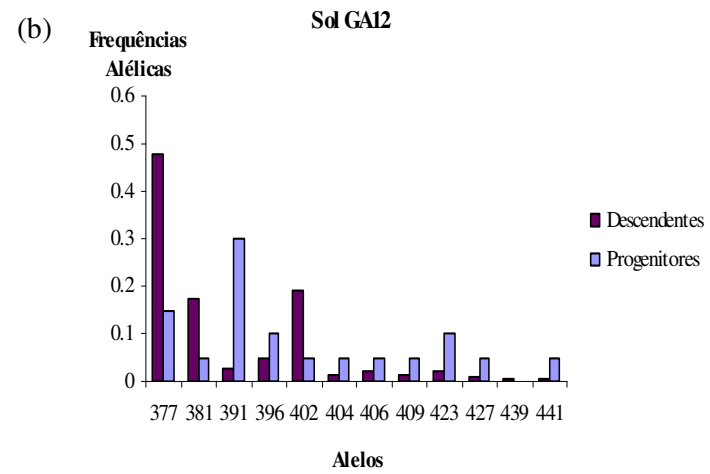
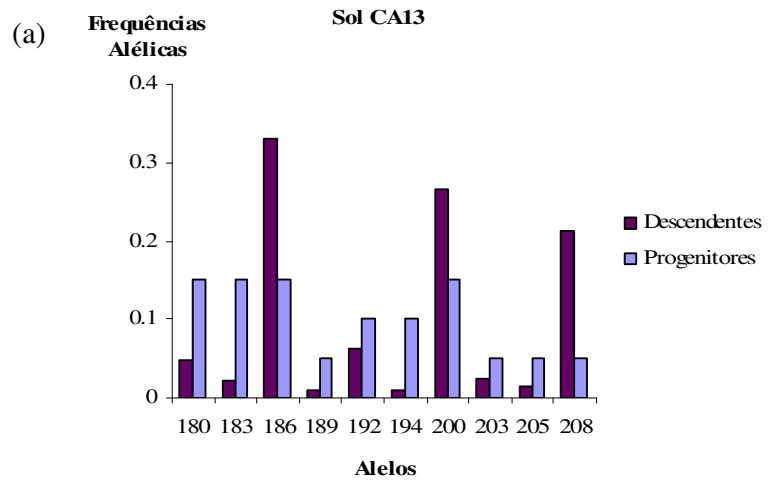


Figura 7- Número de ovos viáveis analisados por dia de amostragem, variando entre os 20 e 26 ovos por postura.

3.2. Análise dos microssatélites e erros de genotipagem

O número e a frequência dos alelos presentes nos progenitores e descendentes apresentam algumas variações (Figura 8). Comparativamente, os progenitores apresentam um maior número de alelos nos *loci* Sol 5D (Figura 8c), Sol MII (Figura 8g), SseGATA38 (Figura 8d) e Sol 13D (Figura 8e), enquanto que os descendentes apresentam a presença do alelo 439 no *locus* Sol GA12 ausente nos progenitores (Figura 8f).



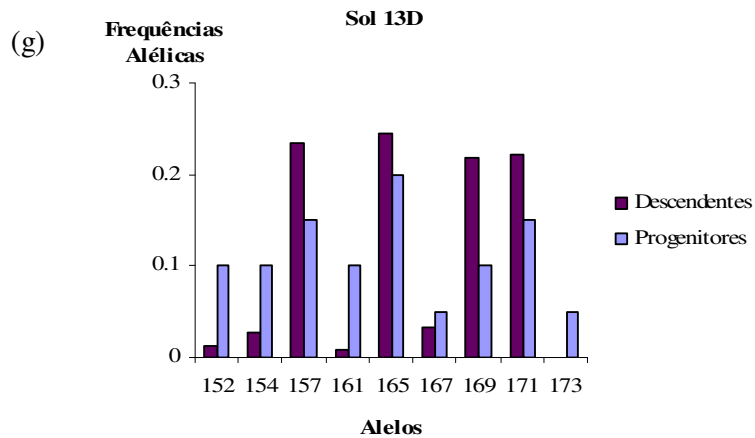
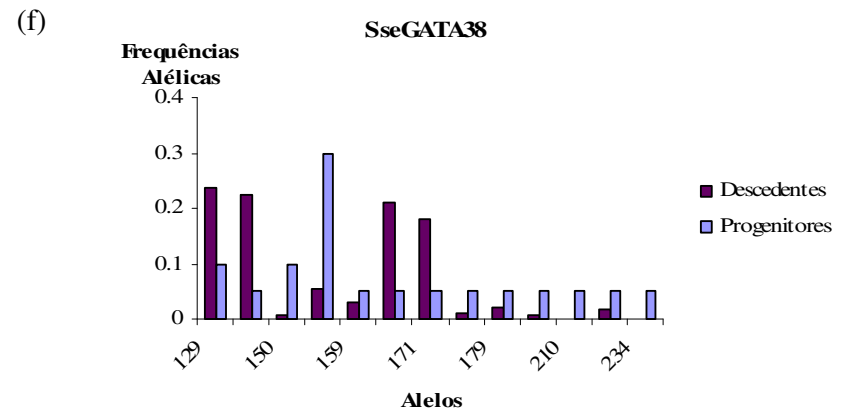
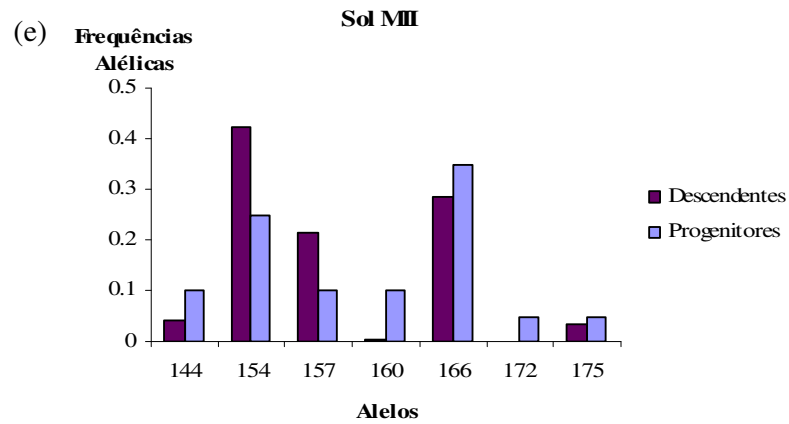


Figura 8- Frequências alélicas dos 7 microssatélites/*loci* analisados para os grupos analisados progenitores e descendentes. *Loci* Sol CA13 (painel a), Sol GA12 (painel b), Sol CA39 (painel c), Sol 5D (painel d), Sol MII (painel e), SseGATA38 (painel f) e Sol 13D (painel g).

O stock de reprodutores em estudo apresentou um total de 63 alelos em 7 *loci*, variando de 6 a 13 alelos/*locus* com um valor médio de 9 alelos por *locus* (Tabela 2). Enquanto que os descendentes apresentam um total de 60 alelos nos *loci* analisados, variando de 6 a 12 alelos/*locus* com um valor médio de 8 alelos por *locus*. Os valores de heterozigotia observados variam entre 0,600 a 1,000 nos progenitores, e entre 0,471 a 0,954 no grupo dos descendentes, enquanto que a heterozigotia esperada varia entre 0,705 a 0,926 nos progenitores e 0,465 a 0,812 nos descendentes. O que nos leva a crer que existe uma elevada variabilidade e um reduzido nível de consanguinidade nos progenitores e uma perda de diversidade nos descendentes. A estimação dos erros de genotipagem revela evidência de alelos nulos em elevadas proporções (5 a 30 %) nos *loci* SseGATA38, Sol MII, Sol 5D e Sol GA12; e de alelos falsos nos *loci* SseCA39, Sol 5D e Sol CA13, apresentando os dois últimos valores baixos, na ordem dos 5%. Podemos constatar que os *loci* SseCA13, SseGATA38 e Sol 13D apresentam uma maior probabilidade de exclusão, de 0,606, 0,592 e 0,581 respectivamente, sendo que a probabilidade de exclusão no conjunto dos 7 marcadores é de 0,992.

Tabela 2- Análise das amostras genotipadas dos progenitores e descendentes. K = número de alelos; N = número de indivíduos que apresenta o *locus*; Ho = Heterozigotia observada; He = Heterozigotia esperada; Prob. Exclusão = Probabilidade de exclusão; HF = Homozigóticos falsos ou alelos nulos; FA = Falsos alelos.

<i>Locus</i>	Progenitores						Descendentes			
	K	Ho	He	Prob. Exclusão	Tipos de erros		K	N	Ho	He
					HF	FA				
SseCA39	7	0,800	0,816	0,388	0,000	0,125	7	440	0,764	0,663
SseGATA38	13	0,900	0,911	0,592	0,050	0,000	11	513	0,955	0,812
Sol MII	7	0,900	0,821	0,406	0,107	0,000	6	507	0,759	0,692
Sol 13D	9	1,000	0,916	0,581	0,000	0,000	8	538	0,926	0,786
Sol 5D	6	0,600	0,705	0,266	0,156	0,050	6	527	0,471	0,465
Sol CA13	10	0,700	0,926	0,606	0,000	0,050	10	521	0,495	0,767
Sol GA12	11	0,700	0,895	0,552	0,295	0,000	12	538	0,954	0,701
Multilocus	9	0,760	0,698	0,992	-	-	8,6	542	0,698	0,760

3.3. Análise de paternidades

Os resultados obtidos estão de acordo com a simulação efectuada pelo programa CERVUS onde se previa a atribuição de paternidade a 86% dos descendentes com 95% de confiança, correspondendo a cerca de 465 ovos, enquanto que a paternidade dos restantes 14%, correspondendo a 77 ovos, foi identificada com uma confiança de 80%.

Ao analisar-se a contribuição de cada progenitor isoladamente, verificou-se que existe uma predominância da fêmea 5, tendo originado cerca de 81% dos descendentes (figura 9), ao longo da época de reprodução. As restantes fêmeas apresentam uma contribuição reduzida (não superior a 5%).

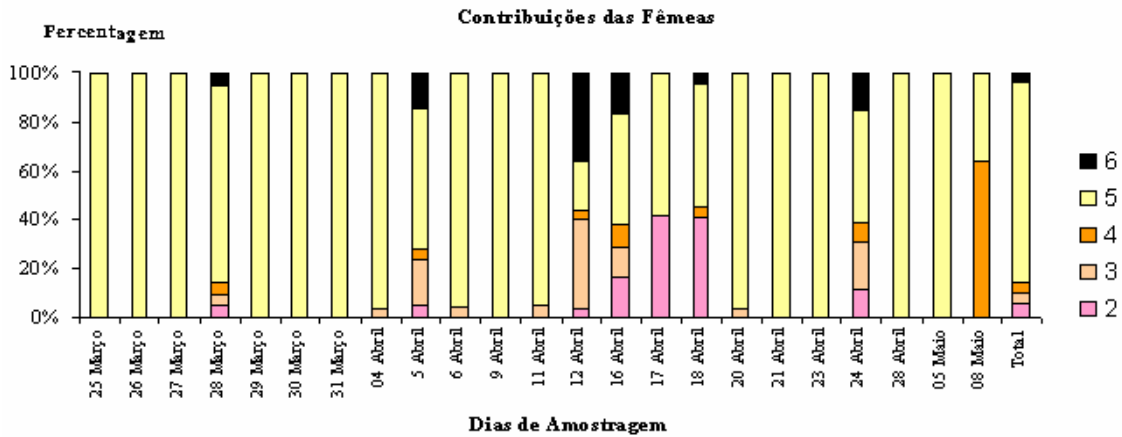


Figura 9 – Contribuição das cinco fêmeas para a descendência ao longo da época de postura.

A mesma tendência foi verificada quanto à contribuição dos machos (figura 10), existindo uma dominância do indivíduo 8 (contribuindo para 84% da descendência), seguido do macho 10 (9%). Verificou-se ainda a existência de contribuições muito reduzidas no caso do macho 7 e 1, com 0,4% e 0,2%, respectivamente. Foi ainda identificado um macho, progenitor 9, que não apresentou qualquer contribuição ao longo da época reprodutiva.

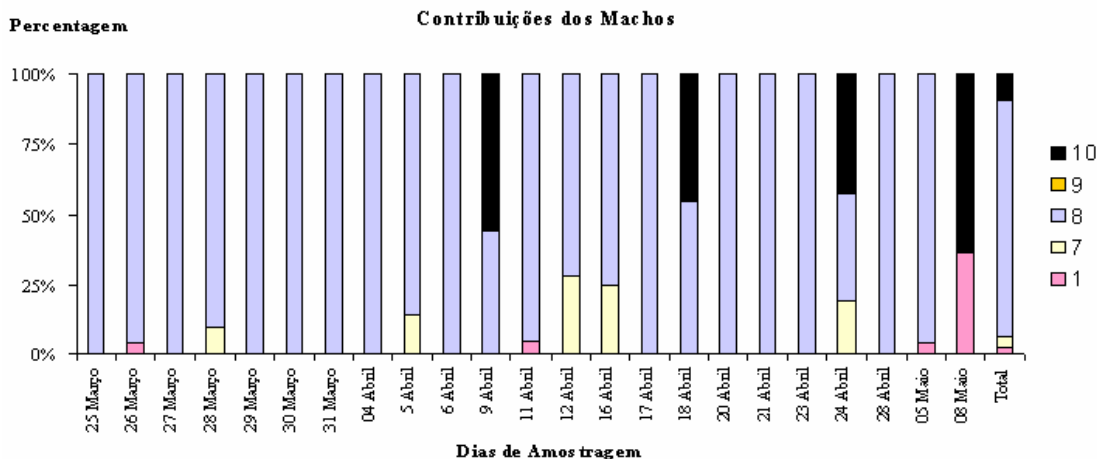


Figura 10 – Contribuição dos cinco progenitores machos para a descendência ao longo da época de postura.

Na figura 11, é possível evidenciar a contribuição de um cruzamento dominante, 5x8, com uma contribuição de 73,6% dos ovos num total de 542, seguido do cruzamento 5x10 com uma contribuição menor de 4,6% descendentes. Em alguns casos foi identificada uma contribuição muito reduzida, 0,2%, resultante do cruzamento entre os progenitores 3x1; 4x8 e 6x10. É de salientar a inexistência de cruzamentos com o indivíduo 9.

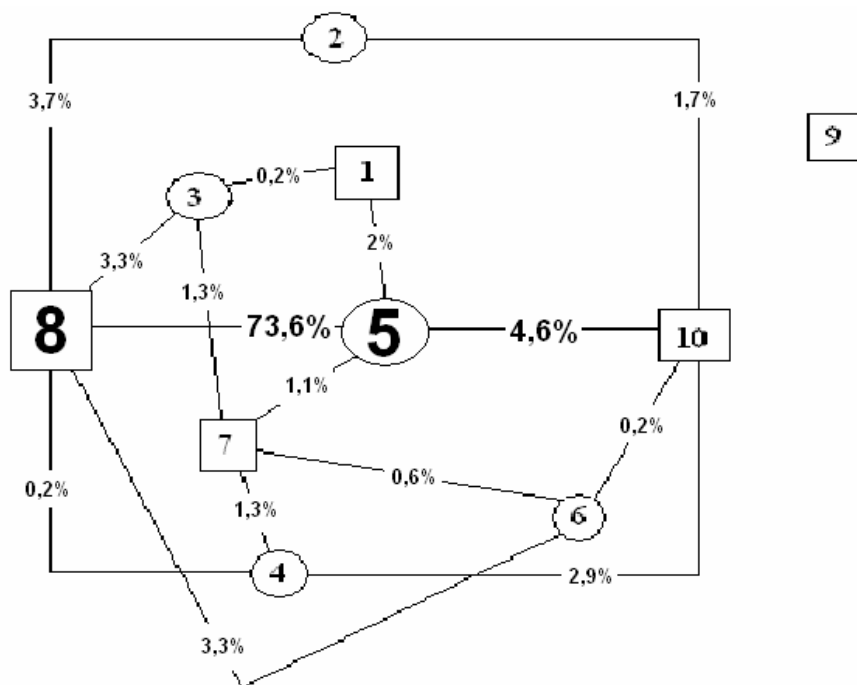


Figura 11 – Dendrograma dos tipos de cruzamento efectuados pelos progenitores e a percentagem da contribuição de cada cruzamento. Em que □ = Machos e ○ = Fêmeas.

4. Discussão

Em aquacultura, o crescente interesse pelo conhecimento de técnicas de cultivo de novas potenciais espécies, como a *Solea senegalensis*, tem contribuído beneficemente para o aumento da eficiência da produção, apresentando-se como uma estratégia para novas oportunidades do mercado económico (Agulleiro *et al.*, 2006; Dinis *et al.*, 1999; Smith, 1998).

4.1. Extracção de ADN

A extracção de ADN consiste num passo fundamental para a elaboração de estudos que envolvam marcadores moleculares sendo este o passo que permite aceder ao material genético alvo de interesse (Aranishi, 2006; Cruickshank, 2002). No decorrer deste estudo o processo de extracção de ADN dos diferentes tipos de amostras revelou-se ineficaz em algumas situações. No que diz respeito às amostras de sangue (amostragem aos reprodutores) o ADN obtido apresenta um grau de pureza reduzido por apresentar proteínas e outros contaminantes, que podem ser visualizados pela técnica de electroforese em gel de agarose. Este resultado pode dever-se ao facto de se ter utilizado uma técnica de extracção com sal, que por vezes apresenta um rendimento mais reduzido e uma qualidade inferior quando comparado com outros métodos, como o da extracção orgânica (Turtinen & Juran, 1997). No entanto é de salientar as desvantagens deste último, que embora possa apresentar um elevado grau de pureza, tem um elevado nível de toxicidade e requer um aumento do tempo investido (Turtinen & Juran, 1997). A utilização de kits comerciais também é uma alternativa para extracção de ADN no entanto, apresentam elevados custos económicos, o que nem sempre torna a sua utilização possível quando se pretende analisar um número elevado de amostras.

A extracção de ADN de amostras com baixas concentrações de material genético é um desafio e nem sempre é possível. As amostras de ovos possuem um reduzido número de células, limitando assim a quantidade de ADN extraído. Nas amostras de descendentes inviáveis a extracção apresentou grandes dificuldades e na maioria dos casos sem sucesso. Os ovos inviáveis podem ser ou ovos não fecundados, apresentando apenas metade da quantidade de material genético de uma célula diplóide ($2n$), ou ovos abortados, que por inúmeras razões pararam o seu desenvolvimento. Nos dois casos o número de células presente é provavelmente muito inferior à necessária para que, com o método utilizado, seja possível obter uma quantidade de ADN visível, não tendo por isso sido possível detectar a presença deste. Devido aos resultados obtidos

optou-se por não utilizar amostras de ovos inviáveis no decorrer deste estudo. Contudo existem métodos de extracção mais sensíveis que poderiam permitir a obtenção de ADN nestas amostras, o que permitiria responder a outras questões de elevado interesse, nomeadamente se existem indivíduos reprodutores que contribuem preferencialmente para os ovos inviáveis. Nas amostras de ovos viáveis, obteve-se um rendimento de extracção elevado embora com uma concentração de ADN muito reduzida, comparativamente com os ovos inviáveis. No entanto é de salientar inúmeras situações em que num mesmo indivíduo nem todos os *loci* amplificaram, podendo revelar que a qualidade de ADN obtido foi aparentemente afectada. Este resultado pode ser explicado pela baixa eficiência do método utilizado (extracção de sal) e/ou o estado de preservação dos ovos, visto que alguns apresentavam-se com uma cor amarelada intensa, podendo ser indicador da degradação celular das amostras. Devido à baixa concentração de ADN obtida, o número de *loci* inicialmente previsto neste trabalho foi reduzido de 10 para 7. Mais uma vez, poderiam ser utilizados métodos de extracção que maximizassem a quantidade de ADN extraído *e.g.* kits de extracção disponíveis no mercado, *e.g.* Qiagen. No entanto, estes métodos são dispendiosos e iriam reduzir o número de amostras a analisar no estudo.

4.2. Erros de genotipagem

Em aquacultura, nem sempre é possível a identificação dos progenitores efectivos e conseqüentemente a avaliação do stock (Oliveira *et al.*, 2006). Segundo Vandeputte *et al.* (2006), erros de genotipagem e/ou a presença de mutações têm sido identificados como uma causa na redução da capacidade de atribuição de paternidades com a utilização do método de exclusão.

A presença de erros é usualmente encontrada em organismos marinhos (Launey *et al.*, 2003) e a sua origem favorecida pela baixa qualidade e quantidade de ADN e/ou por mutações na zona de ligação dos *primers* (Castro *et al.*, 2006; Chapuis & Estoup, 2007; Dakin & Avise, 2004). Os alelos nulos e as mutações constituem também uma fonte de divergência em análise de paternidades, por causarem incompatibilidades entre os descendentes e os verdadeiros progenitores (Callen *et al.*, 1993; Jones & Ardren, 2003). Os erros encontrados poderão estar relacionados com a quantidade e qualidade do ADN, as técnicas de genotipagem e de análise utilizadas e ainda a presença de contaminações (Bonin *et al.*, 2004; Hoffman & Amos, 2005). De facto, em estudos com microssatélites são frequentes taxas de erros de 2% (Bonin *et al.*, 2004; Castro *et al.*,

2004; Hoffman & Amos, 2005), sendo a sua maioria erros de genotipagem, podendo estes ser homozigóticos falsos (ou alelos nulos) ou falsos alelos.

Os resultados obtidos indicam a presença de taxas de erro na ordem dos 9%, sendo o *locus* Sol GA12 responsável por uma excessiva contribuição, apresentando uma taxa de erro de 30%, possivelmente devido à existência de divergências na zona de flanqueamento dos *primers*. O valor obtido é bastante elevado quando comparado com o estudo de Castro *et al.* (2006) que obtém uma taxa de erro de 2,5% (sendo 4 dos *loci* usados comuns). No entanto a grande incidência de alelos nulos no *locus* Sol GA12 é igualmente reportada por Castro *et al.* (2006) e Porta *et al.* (2006), sugerindo que este *locus* deva ser descartado de uma futura análise de paternidade. Quanto à presença de falsos alelos, 3,2% no nosso estudo, com a maior incidência no *locus* SseCA39, com uma taxa de erro individual de 13%, valor elevado que sugere alguma prudência na análise dos dados obtidos com este *locus*. As taxas de falsos alelos estão dentro do que se encontra reportados noutros estudos (Castro *et al.*, 2006 e Hoffman & Amos 2005). De acordo com Marshall *et al.* (1998) e Castro *et al.* (2006) taxas de erros ainda que reduzidas podem afectar as estimativas de diversidade genética e paternidades por apresentarem-se como um factor de falsa exclusão. Neste estudo, a situação que suscita mais atenção é representada pela existência de alelos nulos, principalmente nos *loci* Sol GA12, Sol 5D, Sol MII e SseGATA38, variando de 5 a 30%. Somente tem sido reportado elevadas frequências de alelos nulos em stocks de ostras (McGoldrick *et al.*, 2000).

Embora se tenha obtido uma média de taxas de erro de 12%, a elevada variabilidade e probabilidade de exclusão (0,992) apresentada pelos 7 *loci* microssatélites utilizados é similar a outros estudos (*e.g.* Funes *et al.*, 2004; Porta & Alvarez, 2004 e Porta *et al.*, 2006). Estes *loci* permitiram uma eficiente atribuição de paternidades, confirmando a importância da sua utilização neste tipo de análises, tal como sugerido (Borrell *et al.*, 2004; Jones & Ardren, 2003; Oliveira *et al.*, 2006), assim como a sua utilização como ferramentas indispensáveis no planeamento de estratégias de selecção e manutenção genética de stocks de reprodutores (Porta *et al.*, 2006). Os marcadores utilizados vão de encontro aos resultados obtidos por Castro *et al.* (2006) onde os *loci* Sol CA13 e SseGATA38 apresentam uma elevada probabilidade de exclusão, sendo por isso bons marcadores na análise de paternidades. É de salientar, no entanto, o surgimento de um alelo presente nos descendentes e ausente nos progenitores (alelo 439 no *locus* Sol GA12). Tendo em conta as taxas de erro encontradas, a sua

presença poderá ser explicada pela existência de contaminações durante o processo laboratorial ou a presença de alelos nulos nestes *locus*, revelando mais uma vez que este deverá ser substituído para futuras análises de paternidades.

4.3. Análise de paternidades

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que ao longo da época de reprodução em estudo existe a contribuição sobrelevada de uma única fêmea e de um único macho, o que leva a crer que estes animais poderão encontrar-se em melhor forma biológica e/ou mais bem adaptados às condições de cativeiro ou o facto da espécie possuir um carácter dominante para se reproduzir. No entanto, a não contribuição para a descendência do macho 9 poderá indicar que se encontra biologicamente afectado possivelmente pelas condições de cultivo do stock ou retraído pelo macho dominante. Tendo em conta que todos os progenitores possuem a mesma idade e comprimento, seria interessante analisar as condições biológicas dos diferentes progenitores e verificar possíveis relações com a sua contribuição, nomeadamente a incidência de ovos inviáveis.

O presente estudo demonstra a dominância na contribuição para a descendência de um cruzamento, 5x8, seguido do cruzamento entre os gâmetas produzidos pelos progenitores 5x10, resultado similar ao obtido por Porta *et al.* (2006) em que existe a dominância de dois pares de progenitores. Esta evidência poderá causar o aumento da consanguinidade e conseqüentemente uma diminuição da diversidade genética na geração futura, contribuindo para uma eventual menor capacidade de resistência da descendência quando exposta a alterações das condições ambientais (Martínez, 2005, Sekino *et al.*, 2003). Dado que o principal objectivo, em aquacultura, é o aumento das taxas de sobrevivência e da produção comercial num curto período de tempo (Frost *et al.*, 2006), pensa-se que para a produção não existe necessidade de um grande esforço na manutenção da diversidade genética, visto que o controlo da geração seguinte se destina à comercialização e não à formação de um novo stock de reprodutores (Brown *et al.*, 2005). No entanto, toda a origem do lote ser proveniente de um único cruzamento pode comprometer a produção, sendo por isso necessário recorrer a técnicas que permitam a existência de uma variabilidade genética mínima capaz de garantir a qualidade das posturas e da fecundação.

O número reduzido de descendentes provenientes do cruzamento entre os progenitores 6x10, 3x1 e 4x8 seria explicado pela limitação desta espécie em cativeiro

que se traduz na elevada variabilidade da qualidade de gâmetas e ainda uma reduzida produção de espermatozóides (Cabrita *et al.*, 2006; Garcia-López *et al.*, 2006), caso os descendentes em estudo fossem provenientes de uma geração F1. Segundo o estudo de Mañanos *et al.* 2008 onde ocorreu indução hormonal e posterior fertilização artificial dos gâmetas provenientes de progenitores em cativeiro (F1), verificou-se que as taxas de eclosão são elevadas, o que leva a crer que não existe qualquer problema com a qualidade destes gâmetas. Dado que o lote em estudo é proveniente do selvagem e aclimatado ao cativeiro não existem este tipo de problemas logo poderá ser explicado por algum facto biológico que retrai estes progenitores com contribuições reduzidas e/ou que possa ter existido falhas no método de diferenciação dos ovos, que pode não permitir, nalguns casos, distinguir entre viáveis e inviáveis. É importante salientar que este estudo só foi elaborado numa época de reprodução impedindo o conhecimento do comportamento destes progenitores noutras épocas.

Este estudo identifica diversos cruzamentos, sendo que muitos apresentam reduzidas contribuições. A viabilidade desses ovos não foi testada, e os juvenis resultantes destes cruzamentos podem apresentar taxas de sobrevivência muito reduzidas. Esta questão leva a propor uma continuidade do estudo envolvendo descendentes num estado mais desenvolvido, *e.g.* larvas, determinando as suas taxas de sobrevivência, e tendo em conta taxas de mortalidade, para a obtenção dos padrões de contribuição dos progenitores comparando-os posteriormente com os resultados obtidos neste estudo.

5. Considerações Finais

No presente estudo determinou-se a contribuição de um grupo de reprodutores da espécie *Solea senegalensis* para a descendência ao longo de uma época de reprodução e procedeu-se à construção de padrões parentais. Constatou-se que o método de extracção de ADN utilizado produz amostras de baixa qualidade, o que poderá em algumas situações ter influenciado o poder de atribuição de paternidades em algumas amostras, apesar das vantagens a nível económico. O conjunto dos 7 *loci* de microssatélites analisados apresenta uma elevada probabilidade de exclusão, tornando-os ferramentas indispensáveis na atribuição de paternidades, confirmando o que tem sido descrito por outros autores. Contudo, a elevada percentagem de erros de genotipagem devido à presença de alelos nulos pode tornar-se preocupante, sendo

mesmo viável testar outros marcadores descritos para esta espécie de modo a aumentar a confiança nos marcadores e diminuir as taxas de erros encontradas.

Os resultados obtidos na análise de paternidades permitiram uma percepção do padrão de contribuições, ocorrendo a dominância de um par de progenitores para a descendência, tornando-se indispensável a realização de testes que alterem o *sex-ratio* do stock de reprodutores de modo a rentabilizar a manutenção de grupos de reprodutores com elevadas contribuições para a reprodução, contribuindo para rentabilizar a produção em cativeiro.

6. Perspectivas futuras

De acordo com os resultados obtidos verifica-se a dominância de um par de progenitores que contribuem para a descendência, num tanque de stock de reprodutores com o mesmo *sex-ratio*, durante uma época reprodutiva. Para contrariar este facto e assegurar a variabilidade genética mínima da descendência é sugerido, no futuro, a elaboração de testes que envolvam um maior número de tanques de reprodutores e em cada um deles alterar o *sex-ratio* dos indivíduos reprodutores, de modo a verificar se os resultados obtidos neste estudo se mantêm e se a alteração do *sex-ratio* seria uma solução para a maximização da produção, evitando assim a existência de progenitores com uma reduzida contribuição para a descendência.

Seria também interessante a elaboração de um estudo adicional visando obter dados sobre a qualidade e quantidade de esperma dos diferentes machos, determinando assim a existência de possíveis relações entre a qualidade/quantidade de esperma e os progenitores que mais contribuem com ovos inviáveis. Este estudo, associado a uma análise de paternidades efectuada com larvas, durante várias épocas de reprodução, permitiria obter respostas relativamente à viabilidade dos cruzamentos com um número reduzido de descendentes, visto que possuiria informações sobre as taxas de sobrevivência e mortalidade.

Em conjunto, este tipo de abordagens poderá permitir o delineamento de uma nova estratégia de reprodução visando a maximização da rentabilidade da produção de *S. senegalensis* em aquacultura.

7. Referências Bibliográficas

- Agulleiro, M., Anguis, M., Cañavate, J., Martínez- Rodrigues, G., Mylonas, C. e Cerda, J. (2006) Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* **257**, 511-524.
- Alberto, F. (2008) MsatAllele_1.0R package. *MsatAllele Notes*. Disponível em <http://www.ccmr.ualg.pt/maree/software.php?soft=msatalle>.
- Aranishi, F. (2006) Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conservation Genetics* **7**, 153-156.
- Bachtrong, D., Agis, M., Imhof, M. e Schlötterer, C. (2000) Microsatellite Variability Differs Between Dinucleotide Repeat Motifs- Evidence from *Drosophila melanogaster*. *Mol.Biol.Evol.* **17**, 1277-1285.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. e 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.
- Beuzen, N., Stear, M. e Chang, K. (2000) Review Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal* **160**, 42-52.
- Birkhead, T. & Pizzari, T. (2002) *Reviews Postcopulatory sexual selection*. Volume 3. Nature Publishing Group, 262-274.
- Bonin, A. Bellemain, E., Eidesen, P., Pompanon, F., Brochmann, C. e Taberlet, P. (2004) Invited Review How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**, 3261-3273.
- Borrell, Y., Álvarez, J., Vázquez, E., Pato, C., Tapia, C., Sánchez, J. e Blanco, G. (2004) Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. *Aquaculture* **241**, 133-150.
- Brown, R., Woolliams, J. e McAndrew, B. (2005) Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* **247**, 219-225.
- Cabrita, E., Soares, F. e Dinis, M. (2006) Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* **261**, 967-975.

- Callen, D., Thompson, A. Shen, Y. Phillips, H., Richards, R., Mulley, J. e Sutherland, G. (1993) Incidence and Origin of “Null” Alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 922-927.
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferreiro, I., Sánchez, L. e Martínez, P. (2004) Potencial sources of errors in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* **242**, 119-135.
- Castro, J., Pino, A., Hermida, M., Bouza, C., Riaza, A., Ferreiro, I., Sánchez, L. e Martínez, P. (2006) A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. *Aquaculture* **261**, 1194-1203.
- Cercueil, A., Bellemain, E. e Manel, S. (2002) PARENTE: Computer Program for Parentage Analysis. *Heredity* **93**, 458-459.
- Chapuis, M. & Estoup, A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol* **24** (3), 621-631.
- Chistiakov, D., Hellemans, B. e Volckaert, F. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications : A review with special refence to fish genetics. *Aquaculture* **255**, 1-29.
- Cruickshank, R., (2002) Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology* **7**, 3-14.
- Crow, J. & Kimura, M. (1970) *An introduction to Population Genetics Theory*. Burgess Publishing Company. Minneapolis, P.591.
- Dakin, E. & Avise, J. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, 504-509.
- Dinis, M. (1992) Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: Larval learing and wearing to artificial diets. *Aquaculture Fish Manag.* **23**, 515-520.
- Dinis, M., Soares, F. e Sarasquete, C. (1999) A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* **176**, 27-38.
- Di Rienzo, A., Peterson, A., Garza, J., Valdes, A., Slatkin, M. e Freimer, N. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. "*Proc Natl Acad Sci USA.* **91**(8), 3166–3170.

- Dong, S., Kong, J., Zhang, T., Meng, X. e Wang, R. (2006) Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeis chinensis*) based on microsatellites DNA markers. *Aquaculture* **258**, 283-288.
- Frost, L., Evans, B. e Jerry, D. (2006) Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* **261**, 1056-1064.
- Funes, V., Zuasti, E., Catanese, C., Infante, C. e Machado, M. (2004) Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Molecular Ecology Notes* **4**, 339-341.
- Garcia-Lopez, A., Couto, E., Canário, A., Cañavate, J., Sarasquete, C., Martinez-Rodriguez, G. (2006) Non-invasive assessment of reproductive status and cycle sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalensis Sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture* **254**, 583-593.
- Hoffman, J. & Amos, W. (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* **14**, 599-612.
- Hughes, C. (1998) Integrating Molecular Techniques with Field Methods in Studies of Social Behavior: A revolution Results. *Ecology* **79**, 383-399.
- Imsland, A., Foss, A., Conceição, L., Dinis, M., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P. (2003) A review of the culture potential of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish.* **13**, 379-407.
- Jackson, T., Martin-Robichaud, D. e Reith, M. (2003) Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* **220**, 245-259.
- Jarne, P. & Lagoda, P. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**(10), 424-429.
- Jerry, D., Preston, N., Crocos, P., Keys, S., Meadows, J. e Li, Y. (2004) Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellites markers (Bate). *Aquaculture* **235**, 237-247.
- Jerry, D., Preston, N., Crocos, P., Keys, S., Meadows, J. e Li, Y. (2006) Application of DNA parentage analyses for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds. *Aquaculture* **254**, 171-181.
- Jones, A. & Ardren, W. (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* **12**, 2511-2523.

- Kalinowski, S., Taper, M. e Marshall, T. (2007) Revising ow the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases suces in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, 1099-1106.
- Kasapidis, P. & Magoulas, A. (2008) Development and application of microsatellite markers to address the population structure of the horse mackerel *Trachurus trachurus*. *Fisheries Research* **89**, 132-135.
- Kimura, M. & Crow, J. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-738.
- Kimura, M. & Ohta, T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Genetics* **75**, 2868-2872.
- Laudenbach, V., Mantz, J. e Desmontsl, J. (1999) Comprendre la biologie moleculaire. *Ann Fr Anesth Réanim Elsevier* **18**, 725-47.
- Launey, S., Krieg, F., Haffray, P., Bruant, J., Vanniers, A. e Guyomard, R. (2003) Twelve new microsatellite markers for gilted seabream (*Sparus aurata* L.): characterization, polymorphism and linkage. *Molecular Ecology Notes* **3**(3), 457-459.
- Li, Y., Wongprasert, K., Shekhar, M., Ryan, J., Dierens, L., Meadows, J., Preston, N., Coman, G. e Lyons R. (2007) Development of two microsatellites multiplex systems for bleck tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. *Aquaculture* **266**, 279-288.
- Lui, Z. & Cordes, J. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**, 1-37.
- Ning, Y., Liu, X., Wang, Z., Guo, W., Li, Y. E Xie, F. (2007) A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, *Aquaculture* **264**, 16-26.
- MacAvoy, E., Wood, A. e Gardner, P. (2008) Development and evaluation of microsatellites markers for identification of individual GreenshellTM mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programme. *Aquaculture* **274**, 41-48.
- Malone, C., Wheeler, T., Taylor, J. e Davis, S. (2000) Phylogeography of the Caribbean Rock Iguana (*Cyclura*): Implications for Conservation and Insights on the Biogeographic Gistory of the West Indies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17**, 269-279.
- Mañanós, E., Gruzmán, J., Jesus, R., Mylonas, C., Zohar, J., Peleteiro, J., Chereguini, O., Ducan, N., Sarasquete, C. e Riaza, A. (2008) Hormonal Stimulation of Ovulation, Spermiation and Spawing in the Cultured Senegalense

Sole (*Solea senegalensis*) brookstock. in IV Workshop on the Cultivation of Soles in Universidade do Algarve, Faro, Portugal.

- Marques, J., Teixeira, C. e Cabral, H. (2006) Differentiation of commercially important flatfish populations along the Portuguese coast: Evidence from morphology and parasitology. *Fisheries Research* **81**, 293-305.
- Marsall, T., Slate, J., Bruuk, I. e Pemberton, J. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Matínez, P. (2005) Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* **21**, 225-238.
- McGoldrick, D., Hedgecock, D., English, L., Baoprasertkul, P. e Ward, R. (2000) The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *J. Shellfish Res.* **19**, 779-788.
- Mrázek, J., Guo, M. e Shan, A. (2007) Simple sequence repeats in prokaryotic genomes. *PNAS* **104** (20), 8472-8477.
- Ning, Y., Liu, X., Wang, Z.Y., Guo, W., Li, Y. E Xie, F. (2007) A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, *Aquaculture* **264**, 16-26.
- Norris, A., Bradley, D. e Cunningham, E. (2000) Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* **182**, 73-83.
- Ohara, E., Nishimura, T., Nagakura, Y., Sakamoto, T., Mushiake, K. e Okamoto, N. (2005) Genetic linkage maps of two yellotails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture* **244**, 41-48.
- Oliveira, E., Pádua, J., Zucchi, M. e Vencovsky, R. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Mol. Biol* **29**, 294-307.
- Pérez-Portela, R. & Turon, X. (2008) Cryptic divergence and strong population structure in the colonial invertebrate *Pycnoclavella communis* (Ascidiacea) inferred from molecular data. *Zoology* **111**, 163-178.
- Porta, J. & Alvarez, C. (2004) Development and characterization of microsatellites from Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Molecular Ecology Notes* **4**, 277-279.

- Porta, J., Porta, J., Martínez-Rodríguez, G. e Alvarez, M. (2006) Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalense sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* **256**, 159-166.
- Porta, J., Porta, J., Martínez-Rodríguez, G. e Alvarez, M. (2006) Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* **251**, 46-55.
- Poteaux, C., Bonhomme, F. e Berrebi, P. (1999) Microsatellites polymorphism and genetic impact of restocking in Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* **82**, 645-653.
- Renshaw, M., Saillant, E., Bradfield, S. e Gold, J. (2006) Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum (*Sciaenops ocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* **253**, 731-735..
- Renshaw, M., Saillant, Broughton, R. e Gold, J. (2006) Application od hypervariable genetic markers to forensis identification of “wild” from hatchery-raised red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Forensic Science International* **156**, 9-15.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*, 3ª Edição, Volume 3; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, P.1621.
- Small, M., Beacham, T., Withler, R. e Nelson, R. (1998) Discriminating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) population within the Fraser River, British Columbia, using microsatellites DNA markers. *Molecular Ecology* **7**, 141-155.
- Smith, J. (1989) *Evolucionary Genetics*. 1ª Edição. Oxford: Oxford University Press, New York. P.325.
- Schlötterer, C. (1998) Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology* **8**, 132-134.
- Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M. e Yamashita, Y. (2003) Microsatellites-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancemement program. *Aquaculture* **221**, 255-263.
- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simples sequences as a general soureces for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.

- Thanh Thai, B., Burridge, C. e Austin, C. (2007) Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in Vietnam using four microsatellite loci. *Aquaculture* **269**, 174-186.
- Turtinen, L. & Juran, B. (1997) Protein Salting-out Method Applied to Genomic DNA Isolation from Fish Whole Blood. *BioTechniques* **24**, 238-239.
- Yamada, N., Smith, G., Castro, A., Roques, C., Boyer, J. e Farber, R. (2002) "Relative rates of insertion and deletion mutations in dinucleotide repeats of various lengths in mismatch repair proficient mouse and mismatch repair deficient human cells." *Mutation Research* **499**, 213–225.
- Valière, N. (2002) GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* **2**, 377-379.
- Vandepuute, M., Mauger, S. e 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.
- Zane, L., Bargelloni, L. e Patarnello, T. (2002) Invited review Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecology* **11**, 1-16.

8.Anexo

Este trabalho foi apresentado oralmente no III Encontro Nacional de Pós-Graduações em Ciências Biológicas realizado na Universidade do Algarve pelo CCMar de 3 a 5 Setembro de 2008.

Contribuição Parental do linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) em Aquacultura

Céline Madeira, Sara Mira¹, Elsa Cabrita¹, Florbela Soares¹, M. Leonor Cancela¹

¹ Centro de Ciências do Mar (www.ccmar.ualg.pt)

Desde os anos 80, que o linguado do Senegal (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) tem sido um potencial alvo para o cultivo intensivo no Sul da Europa, nomeadamente devido ao seu importante valor económico. No entanto, existem ainda algumas limitações, nomeadamente no que se refere ao baixo controlo reprodutivo em cativeiro. Em aquacultura, controlar o número de reprodutores necessários é importante para a produção de uma descendência viável e variável, de modo a assegurar a sua sobrevivência evitando elevados níveis de consanguinidade e seus efeitos deletérios. Do ponto de vista económico, é também indispensável garantir que os reprodutores utilizados contribuam para a formação da descendência.

Neste estudo, utilizou-se um grupo de 10 reprodutores e analisaram-se aproximadamente 25 ovos de cada postura diária efectuadas entre os meses de Março e Maio de 2007. Para a determinação da paternidade utilizaram-se 7 *loci* microsatélites. Identificou-se cerca de 86% dos progenitores com uma confiança de 95% e os restantes foram resolvidos com uma confiança de 80%. Este estudo demonstra que existe a dominância de um par de progenitores ao longo de toda uma época reprodutiva. Os resultados obtidos permitem propor novas abordagens no que se refere à caracterização dos grupos de reprodução nesta espécie.

Agradecimentos: S.Mira e E.Cabrita são bolsistas da FCT (SFRH/BPD/23514/2005 e SFRH/BPD/12629/2003). Trabalho financiado pelo PROMAR SP5.P117/03 INTERREG IIIA.