



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Bianca Maria Soares Scaranto

**Caracterização da diversidade e estrutura genética de populações selvagens de
Crassostrea gasar e contribuição parental de *Crassostrea gigas*, através de marcadores
moleculares**

Florianópolis,

2023

Bianca Maria Soares Scaranto

Caracterização da diversidade e estrutura genética de populações selvagens de *Crassostrea gasar* e contribuição parental de *Crassostrea gigas*, através de marcadores moleculares

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Prof. Claudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coorientadora: Josiane Ribolli, Dra.

Florianópolis,

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Scaranto, Bianca Maria Soares

Caracterização da diversidade e estrutura genética de populações selvagens de *Crassostrea gasar* e contribuição parental de *Crassostrea gigas*, através de marcadores moleculares / Bianca Maria Soares Scaranto ; orientador, Claudio Manoel Rodrigues de Melo, coorientadora, Josiane Ribolli, 2023.

71 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. ostras. 3. marcadores moleculares. 4. metodologias de reprodução. 5. genética populacional. I. Melo, Claudio Manoel Rodrigues de . II. Ribolli, Josiane . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Bianca Maria Soares Scaranto

Título: Caracterização da diversidade e estrutura genética de populações selvagens de *Crassostrea gasar* e contribuição parental de *Crassostrea gigas*, através de marcadores moleculares

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Claudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Carolina de Barros Machado da Silva, Dra.
Universidade Federal do Sul da Bahia

Profa. Flávia Lucena Zacchi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Rosane Silva Dos Santos, Dra.
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Prof. Claudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023

Esta tese é dedicada aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de fazer o curso de Pós-Graduação em Aquicultura.

Ao orientador Prof. Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

Agradeço em especial à coorientadora Dra. Josiane Ribolli, pelos ensinamentos, pela enorme paciência, disposição e incentivos durante este período.

Gostaria de agradecer a Carolina Lopes, que me auxiliou nas análises de parentescos.

A todos os funcionários, técnicos, professores e alunos do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), em especial Chico, João Paulo, Tatu, Jaque, Juan, Alexandre, Carlos Manoel, Itamar, Josué, Vanessa, Thais e Hugo.

Gostaria de agradecer em especial, Graziela Vieira minha parceira de todas as horas e braço direito e esquerdo e que me ajudou muito na execução de todo meu experimento, além de ser uma grande amiga em todo período de doutorado.

Aos Laboratórios: Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) e ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), pela cessão da infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho, e a equipe destes que se disponibilizaram a me ajudar no uso dos equipamentos durante este período Lilian, Carol, Lenon, Julia, Tales e ao Professor Valdir.

Aos meus familiares, gostaria de agradecer o apoio durante esta jornada. Ao meu pai Reni, minha mãe Elza, minhas irmãs Daniela, Sabrina e Fabíola e meu marido Flavio.

A todos, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

Às agências de fomento, FAPESC e CAPES pela bolsa de estudos como apoio financeiro para que eu conseguisse realizar minha pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A produção de moluscos bivalves tem uma importância crescente em âmbito mundial, devido a aspectos econômicos e alimentares. A produção de estoques de reprodutores em sistemas fechados pode resultar na diminuição da diversidade genética, no aumento da endogamia e mudança na frequência de genes. Este último ocorre devido à deriva, criação seletiva e devido à domesticação da espécie, tornando-a vulnerável a doenças e fatores ambientais, quando não há metodologias de acasalamento adequadas. As práticas de manejo reprodutivo de espécies cultivadas em cativeiro têm como importante ferramenta no monitoramento da diversidade genética da prole. Os marcadores moleculares tipo microsatélites são ideais para estudos de mapeamento genético, análises de diversidade, estrutura genética populacional e avaliação de parentesco, uma vez que são altamente polimórficos e codominantes. Desta forma, os objetivos deste estudo foram estimar a contribuição parental, diversidade genética e relacionamentos de populações de *Crassostrea gigas* cultivadas através de reprodução em *pool*, e determinar a estrutura e diversidade genética de populações de *Crassostrea gasar* de indivíduos provenientes de cultivo do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC) e de quatro populações selvagens. As comparações genéticas espaciais revelaram a existência de dois principais grupos genéticos de *C. gasar*, um formado pela população proveniente de cultivo (FAR) e um outro grupo composto pelas populações selvagens ao longo do litoral Sul e Sudeste do Brasil (CAN, SFS, PAR e FLN). Embora não tenha estrutura genética entre as populações selvagens, é possível observar um gradiente de distribuição na análise de discriminante de componentes principais, coerente com a distribuição geográfica dos mesmos, contudo, insuficiente para diferenciá-los geneticamente. Apesar do processo artificial de reprodução da população de cultivo, o nível de diversidade foi semelhante entre todas as populações analisadas, com heterozigosidade esperada variando entre 0,703 (FAR) e a 0,738 (FLN). Os valores de diversidade genética da população de cultivo permaneceram relativamente elevados indicando que a população, baseados nos loci avaliados, possui potencial evolutivo frente a fatores estocásticos. As análises de parentesco realizados para *C. gigas* demonstraram que a contribuição parental é desigual e que a técnica de *pool* de gametas utilizada na reprodução das ostras gera uma prole descendente de poucos machos e fêmeas, o que resultaria em uma perda de diversidade genética a longo prazo. As análises moleculares de atribuição de parentesco indicaram que uma desova com 25 casais, 15 (60%) machos e 19 (76%) fêmeas foram identificados como possíveis pais. Vários fatores podem ter colaborado para que a contribuição desproporcional, tanto entre machos e fêmeas tenha ocorrido, dentre eles, a qualidade dos gametas individuais, a interação espermatozoide-óvulo, a competição espermática, o descarte das larvas com crescimento lento durante o manejo da larvicultura, e a desigual sobrevivência da prole. Os marcadores microsatélites utilizados neste estudo se mostraram eficientes tanto para as análises de diversidade e estrutura genética quando para a aferição de parentesco. A partir dos resultados obtidos neste estudo o LMM/UFSC poderá desenvolver novas gestões do manejo reprodutivo, pois neste analisamos aspectos genéticos como contribuição parental e diversidade genética em progênies, obtidas a partir de diferentes sistemas de acasalamento.

Palavras-chave: Aquicultura, ostras, marcadores moleculares, metodologias de reprodução, genética populacional.

ABSTRACT

The production of bivalve mollusks is of increasing importance worldwide due to economic and food aspects. Breeding production in closed systems may result in a decrease in genetic diversity, an increase in inbreeding, and a change in gene frequency due to drift, selective breeding, and due to domestication of the species, become them vulnerable to diseases and environmental factors, when proper mating methodologies are not in place. Reproductive management practices of captive-bred species have as an important tool for the control the genetic diversity of the offspring. Microsatellite markers are ideal for genetic mapping studies, diversity analysis, the genetic structure of populations, and the assessment of relatedness since they are highly polymorphic and codominant. Thus, the objectives of this project were to estimate parental contribution, genetic diversity, and relationships of cultured *Crassostrea gigas* populations through gametes pool, and to determine the genetic structure and diversity of *Crassostrea gasar* populations from cultivated populations and wild populations. The spatial genetic comparisons revealed the existence of two main genetic groups of *C. gasar*, one formed by the cultivated populations (FAR) and another group composed of wild populations along the south and southeast Brazilian coast (CAN, SFS, PAR e FLN). Although there is no genetic structure among the wild populations, it is possible to observe a distribution gradient in the principal components discriminant analysis, consistent with their geographical distribution, however, insufficient to differentiate them genetically. Despite the process of artificial reproduction of the breeding population, the level of diversity was similar among all populations analyzed. The expected heterozygosity ranged from 0.703 cultivation to 0.738 wild population. The genetic diversity values of the cultured population remained relatively high, indicating that the population, based on the evaluated loci, has evolutionary potential in the face of stochastic factors. Parentage analyses performed for *C. gigas* showed that parental contribution is uneven and that the gamete breeding technique used in oyster reproduction proved inefficient, with offspring descended from few males and females. Molecular analyses of kinship assignment indicated that in a spawning with 25 pairs, 15 (60%) males and 19 (76%) females were identified as possible parents. Several factors may have contributed to the disproportionate contribution among the parents, including individual gamete quality, sperm-egg interaction, sperm competition, elimination of slow-growing larvae during larval management, and uneven larval survival. The microsatellite markers used in this study proved efficient for analyzing diversity and genetic structure and measuring kinship. From the results obtained in this study, the LMM/UFSC will be able to develop new management of reproductive management, because in this we analyze genetic aspects such as parental contribution and genetic diversity in progenies, obtained from different mating systems.

Keywords: Aquaculture, oysters, molecular markers, breeding methodologies, population genetics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1	PROBLEMÁTICA E JUSTIFICATIVA.....	9
1.2	PRODUÇÃO AQUÍCOLA	9
1.3	ESPÉCIES ESTUDADAS.....	10
1.4	MONITORAMENTO GENÉTICO.....	12
1.5	OBJETIVOS	13
1.5.1	Objetivo geral.....	13
1.5.2	Objetivos específicos	13
1.6	ESTRUTURA DA TESE	14
2.	ARTIGO 1	15
2.1	INTRODUÇÃO.....	16
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.2.1	Coleta de amostra	18
2.2.2	PCR-RFLP para identificação das espécies	19
2.2.3	Amplificação de microssatélites.....	20
2.2.4	Análises estatísticas.....	20
2.3	RESULTADOS	21
2.4	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	30
2.5	REFERÊNCIAS	34
3	ARTIGO 2	40
3.1	INTRODUÇÃO.....	41
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.2.1	Origem dos animais experimentais e reprodução.....	44
3.2.2	Larvicultura e assentamento	44
3.2.3	Coleta de material.....	46
3.2.4	Extração do DNA e amplificação	46
3.2.5	Análises estatísticas.....	47
3.2	RESULTADOS	48
3.3	DISCUSSÃO	56
3.5	REFERÊNCIAS	59
4	CONCLUSÃO GERAL.....	65
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 PROBLEMÁTICA E JUSTIFICATIVA

O cultivo de ostras nas regiões subtropicais brasileiras está ligado à domesticação de espécies nativas e ao desenvolvimento de programas de reprodução e produção de sementes em laboratórios (BORGHETTI; SILVA, 2007; FERREIRA et al., 2011). Os programas tradicionais de cultivo em aquicultura seguem como padrão, a formação de uma população base, composta de descendentes selecionados a partir de reprodutores que apresentam características de interesse (como por exemplo, tolerância à variação de temperatura, à salinidade e taxa de crescimento superior) XU et al., 2019; IN et al., 2016) sem adicionar animais selvagens ao núcleo reprodutor, pois a adição de animais selvagens pode vir a degradar a resposta de seleção genética (GJEDREM; BARANSKI, 2009). A reprodução de organismos aquáticos em laboratório segue técnicas de fecundação utilizando *pool* de gametas femininos e masculinos, provenientes de diversos reprodutores. Esta técnica permite a presença de diversos materiais genéticos, possibilitando uma maior combinação de alelos na prole (YASUI, 1998; GOES, 2016; XU et al., 2019).

A seleção direcionada, associada a cruzamentos realizados com um baixo número de parentais, resultará em elevação dos coeficientes de endocruzamento e variabilidade genética levando ao declínio no nível de heterozigose em seus descendentes, os tornando vulneráveis às doenças e fatores ambientais (MATEUS et al., 2004; GJEDREM; BARANSKI, 2009). Além do mais, a produção de estoques de reprodutores em sistemas de acasalamentos induzidos pode resultar na diminuição da diversidade em comparação às populações selvagens (BOUDRY et al., 2002).

Com isso, a manutenção da diversidade genética ao longo de gerações segue sendo um dos maiores desafios da indústria aquícola (XU et al., 2019; VARNEY; WILBUR, 2020).

1.2 PRODUÇÃO AQUÍCOLA

A produção aquícola cresceu nas últimas décadas, como consequência direta da demanda por proteína animal da redução dos estoques pesqueiros. De acordo com a FAO (2022), os moluscos têm importância crescente em âmbito mundial, com uma produção de 17,5 milhões de toneladas em 2020, sendo o segundo grupo animal mais cultivado no mundo, e o

terceiro mais cultivado no Brasil ficando atrás apenas de peixes e camarões. Em 2021 o estado de Santa Catarina contribuiu com 95,3% da produção da malacocultura brasileira (IBGE, 2022).

No que diz respeito à produção mundial de moluscos, a espécie *Crassostrea gigas*, apresenta elevada importância, sendo a terceira espécie mais cultivada (FAO, 2022), e a segunda mais cultivada no Brasil.

No âmbito nacional, a produção de moluscos teve seu início como atividade comercial estabelecida nos anos 90. Esta produção inclui quatro espécies de moluscos bivalves: o mexilhão *Perna perna* (LINNEUS, 1758), a ostra do Pacífico *C. gigas* (THUNBERG, 1793), trazida ao Brasil na década de 70 com o objetivo de ser produzida, *C. gasar* (DAUTZENBERG 1891) com protocolo de produção comercial estabelecido nos anos 2000, e vieira *Nodipecten nodosus* (LINNEUS, 1758) (MPA, 2011).

No Brasil, não obstante o crescimento registrado, o setor produtivo de moluscos bivalves está em desenvolvimento e em busca de novas espécies nativas com potenciais de cultivo e com um bom desempenho zootécnico e econômico. Entre as espécies que apresentam esse potencial de cultivo desejado estão as espécies nativas *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) e *C. gasar*.

A ostra do mangue, *C. gasar*, é a principal espécie nativa cultivada no Brasil. No entanto, a produção desta espécie ainda não se encontra completamente consolidada (SABRY, 2010), pois até meados dos anos 2000 *C. gasar* era erroneamente identificada como *C. rhizophorae* (GNÁCIO et al., 2000; LAPÈGUE et al., 2002; LAZOSKI et al., 2011). Esse cenário contribuiu para o atraso no desenvolvimento do setor produtivo para as espécies nativas. Tal fato contribuiu para que a produção de ostras no Brasil fosse concentrada na ostra do Pacífico, espécie que apresenta crescimento rápido nas águas das Baías de Florianópolis, região que reúne a maior parte de cultivo de ostras do país.

1.3 ESPÉCIES ESTUDADAS

A ostra *Crassostrea gasar* é naturalmente encontrada em ambientes estuarinos e regiões de manguezais, onde vive fixada nas raízes do mangue ou em rochas (NASCIMENTO, 1991; RIOS, 1994). Apresenta ampla distribuição, sendo encontrada na costa ocidental da África, do Senegal até o Norte de Angola (CARPENTER; DE ANGELIS, 2016), e na América do Sul, da Guiana Francesa até o sul do Brasil (LAPÈGUE et al., 2002). Por habitar regiões de água mais quentes, tem sua distribuição tanto em ambientes de clima tropical quanto subtropicais. É uma espécie eurialina e euritérmica (GALTISOFF, 1964; QUAYLE, 1989), que pode alcançar mais

de 70 mm de altura (LEGAT et al., 2017). A reprodução de *C. gasar* em laboratório é realizada através de desova induzida em massa com aproximadamente 300 animais sem sexo determinado. As etapas de indução envolvem estímulos físicos como fluxo de água, choque de temperatura e exposição ao ar, além da estimulação biológica que ocorre através da adição da raspagem de gametas de indivíduos sexualmente maturo (SILVEIRA et al., 2011). Após 24h da fecundação já podem ser observadas larvas D, neste estágio estas apresentam capacidade de se alimentar e precisam ser transferidas para os tanques de larvicultura, para o desenvolvimento larval podendo variar de 18 a 30 dias (FAO, 2005-2015). Após este período as larvas passam por mudanças morfológicas, iniciando o assentamento e metamorfose. Passando da fase natante para de fixação, sendo denominadas de pré semente, ao atingirem por volta de 0,5 cm, passam a se chamar sementes (GOSLING, 2003).

A ostra do Pacífico *C. gigas* é originária da região do Pacífico. Encontra-se naturalmente no Japão, Coréia e China (IMAI, 1982), e foi introduzida em diversos países da Europa, América, África e Oceania (KOCHMANN et al., 2012), devido à suas características de interesse biológico e econômico, como crescimento rápido, ampla tolerância às condições ambientais diversas, alta resistência às doenças e elevado valor econômico (FAO, 2022; DUNDON et al., 2015). No Brasil, *C. gigas* foi introduzida por instituições de pesquisa e universidades dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina, entre os anos 70 e 80 (COSTA, 1983; RAMOS, 1986; POLI, 1993). A primeira produção comercial da ostra do Pacífico em Santa Catarina foi iniciada no ano de 1991 com o intuito de propiciar uma alternativa à pesca artesanal (OLIVEIRA NETO, 2005). A reprodução de *C. gigas* em laboratório de modo geral utiliza o método de indução à desova através do *strip* (raspagem do tecido gonádico) de machos e fêmeas sexualmente maduros em recipientes separados para em seguida proceder com a fecundação direta da solução de oócitos com a solução de esperma (FAO, 2005-2015). Outro método aplicado é a desova em massa, que tem como premissa a liberação simultânea de gametas de vários indivíduos em um único tanque, induzida por meio do aumento da temperatura (UTTING; SPENCER, 1991). Independentemente do método de desova aplicado, depois de 24h pode-se visualizar larvas D, que nesta fase já se alimentam e devem ser transferidas para o tanque de larvicultura. O desenvolvimento larval pode variar de 18 a 30 dias, e no final da larvicultura, larvas iniciam assentamento e metamorfose (HELM et al., 2004). Transacionando do hábito natante para de fixação, sendo denominadas de pré semente, ao alcançarem aproximadamente 0,5 cm, são denominadas sementes (GOSLING, 2003; FAO, 2005-2015).

O cultivo de sementes é uma atividade que ainda é realizada por poucos laboratórios. Em Santa Catarina, o Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina foi responsável por aproximadamente 83% do total de sementes de moluscos produzidas no país em 2020 (IBGE, 2022).

A espécie nativa *C. gasar* também se apresenta como alternativa ao cultivo de *C. gigas*, uma vez que as taxas de crescimento e sobrevivência de *C. gigas* é afetada positivamente pelas maiores temperaturas do mar no sul do Brasil (POLI, 2004; BRUNETTO, 2018).

Apresentando muitas vantagens em comparação à outras espécies, *C. gasar* é a espécie nativa de ostra mais cultivada (CHRISTO et al., 2006; NASCIMENTO, 2018), por apresentar um bom desempenho zootécnico (BALDAN; BENDHACK, 2009; GALVÃO et al., 2009; LEGAT et al., 2017; LOPES et al., 2009; PEREIRA et al., 2018), como maior quantidade de carne e melhor crescimento durante o período de verão quando comparada à espécie *C. gigas* cultivadas em regiões tropicais e subtropicais (BRUNETTO et al., 2020).

1.4 MONITORAMENTO GENÉTICO

De modo geral, espécies marinhas como moluscos, em condições naturais, apresentam acasalamento poligâmico, com altas taxas de fecundidade e mortalidade nas fases iniciais de seu desenvolvimento, gerando assim uma variação no sucesso reprodutivo (BOUDRY et al., 2002; GJEDREM, 2005). Esse conjunto de fatores pode resultar na perda de diversidade genética e depressão endogâmica (LIND et al., 2009; MILLER et al., 2012; PLOUGH et al., 2016), além de dificultar a atribuição de parentesco (DAI et al., 2014).

A contribuição parental desequilibrada é uma preocupação para programas de reprodução seletiva que envolvem espécies de desova em massa (BOUDRY et al., 2002). A competição reprodutiva dos gametas pode levar à contribuição parental desequilibrada. Conseqüentemente ocorre a diminuição do sucesso reprodutivo, gerando uma forte redução do tamanho efetivo da população, que pode ser atribuído a fatores como qualidade dos gametas, competição espermática e sobrevivência diferencial entre as famílias (BOUDRY et al., 2002; TARIS et al., 2005). A utilização de um *pool* de gametas provenientes de poucos reprodutores na desova pode reduzir a contribuição genética individual devido às contribuições gaméticas desproporcionais (RIBOLLI; ZANIBONI-FILHO, 2009), pode estar contribuindo para a ocorrência de deriva e perda da diversidade genética na prole (HEDGECOCK; SLY, 1990; BOUDRY et al., 2002).

A perda na diversidade genética e no tamanho efetivo da população tem sido amplamente relatada em sistemas de cultivo de peixes (WANG et al., 2011; ZHOU et al., 2020) e moluscos (MILLER et al., 2012; CHEN et al., 2017; VARNEY; WILBUR, 2020). A redução contínua de diversidade genética nas populações base reduz a possibilidade de futuro ganho genético, e tornam seus descendentes suscetíveis às alterações ambientais nos sistemas de produção, devido à fixação de genes recessivos desinteressantes para a produção (EDING, 2002; YU; LI, 2007; ZHONG et al., 2016).

Neste cenário, os marcadores microssatélites são amplamente utilizados em estudos de genética animal e cultivos para caracterizar a variabilidade genética dos estoques pesqueiros (FERGUSON et al., 1995; XIAO-GU et al., 2006; ZHANG et al., 2017; MELO et al., 2008; LU et al., 2011; VARNEY; WILBUR, 2020). A utilização de microssatélites permite estimar o nível de diversidade genética dos estoques de reprodutores (LOPES et al., 2009), possibilitando conduzir cruzamentos direcionados e manejo reprodutivo, evitando a redução da variabilidade (ZHANG et al., 2017), minimizando a endogamia e o afinilamento genético nas gerações futuras (RIBEIRO et al., 2016;; XIAO-GU et al., 2006).

Estimar o nível de diversidade de estoques reprodutores permite conduzir os cruzamentos direcionados e manejo reprodutivo visando a manutenção da variabilidade genética (MOREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Assim, é possível reduzir o efeito da endogamia e o afinilamento genético (POVH et al., 2005; YU; LI, 2007).

Deste modo, surge a necessidade de compreender a composição genética do estoque de ostras produzidas em laboratório assim como das populações de ambiente natural, a fim de verificar os potenciais efeitos genéticos induzidos através da reprodução seletiva.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Determinar a estrutura e diversidade genética de populações de *Crassostrea gasar* de indivíduos provenientes de cultivo e de populações selvagens, e estimar a contribuição parental, diversidade genética e relacionamentos de populações de *Crassostrea gigas* cultivadas através de reprodução em *pool*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Estimar a diversidade genética de *C. gasar* de indivíduos provenientes de cultivo e do ambiente natural através da utilização de marcadores microssatélites;

- Inferir sobre a estrutura genética de *C. gasar* de indivíduos provenientes de cultivo e do ambiente natural através da utilização de marcadores microssatélites.
- Determinar a contribuição parental de *C. gigas* em fecundação utilizando *pool* de gametas, através do uso de marcadores microssatélites;
- Determinar relacionamentos parentais de *C. gigas* e da prole por meio de marcadores moleculares microssatélites.

1.6 ESTRUTURA DA TESE

A tese foi estruturada em três partes: uma introdução geral e dois artigos, organizados da forma descrita abaixo:

Introdução geral – apresentando a contextualização do tema e objetivos.

Artigo 1 – Estrutura genética e diversidade de populações selvagens e cultivadas da ostra do mangue *Crassostrea gasar* Dautzenberg (1891) do sul do Brasil

Artigo 2 – Contribuição parental de *Crassostrea gigas* em fecundação em *pool* de gametas

2. ARTIGO 1

Estrutura genética e diversidade de populações selvagens e cultivadas da ostra do mangue
Crassostrea gasar Dautzenberg (1891) do sul do Brasil

Bianca Maria Soares Scaranto^a, Josiane Ribolli^{b*}, Graziela Cleuza Vieira^a, João Paulo Ramos Ferreira^a, Carlos Henrique Araujo de Miranda Gomes^a, Claudio Manoel Rodrigues De Melo^a

^a Laboratório de Moluscos Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88061-600, Brasil.

^b Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

* Endereço de e-mail do autor correspondente: josianeribolli@gmail.com (J.Ribolli)

Resumo

A ostra do mangue (*Crassostrea gasar*) é a segunda espécie de ostra mais cultivada no Brasil, e apresenta alto potencial para aquicultura. No entanto, a seleção artificial, a alta fecundidade e a grande variação no sucesso reprodutivo podem resultar em perda de diversidade genética e endogamia principalmente em populações de cultivo. Neste estudo, investigamos a estrutura e diversidade genética em *C. gasar* de populações selvagens e cultivadas, avaliadas por 14 marcadores microssatélites. As comparações genéticas espaciais revelaram a existência de dois principais grupos genéticos de *C. gasar*, um formado pela população proveniente de cultivo e um outro grupo composto pelas populações selvagens ao longo do litoral Sul e Sudeste do Brasil. Embora não exista uma estrutura genética comum entre as populações selvagens, é possível observar um gradiente de distribuição na análise discriminante de componentes principais, coerente com a distribuição geográfica dos mesmos, contudo, insuficiente para diferenciá-los geneticamente. No entanto, é insuficiente para diferenciá-los geneticamente. Apesar da reprodução artificial, os valores de diversidade genética da população cultivada permaneceram relativamente altos e não apresentaram redução. Portanto, monitorar a população cultivada e estabelecer valores de referência para a diversidade genética permitirá a adoção de estratégias tanto para a viabilidade da população cultivada quanto para o manejo das populações selvagens.

Palavras-chave: Aquicultura, Moluscos bivalves, Consanguinidade, Ostras, Reprodução seletiva, População selvagem

Abstract

The mangrove oyster (*Crassostrea gasar*) is Brazil's second most cultured species and presents a high potential for aquaculture. However, artificial selection in a highly fecund species and significant variance in reproductive success can result in the loss of genetic diversity and inbreeding, especially in cultivated populations. In this study, we investigated the genetic structure and diversity of *C. gasar* in wild and cultivated populations using 14 microsatellites. Spatial genetic comparisons revealed the existence of two main genetic groups of *C. gasar*, one comprising the population in cultivation and the other formed by wild populations along the southern and southeastern coasts of Brazil. Although no common genetic structure exists among wild populations, it is possible to observe a distribution gradient based on discriminant analysis of principal components consistent with their geographic distribution. However, it is insufficient to differentiate them genetically. Despite artificial reproduction, the genetic diversity values of the cultivated population remained relatively high and did not show a reduction. Therefore, monitoring the cultivated population and establishing reference values for genetic diversity will allow the adoption of strategies both for the viability of the cultivated population and the management of wild populations.

Keywords: Aquaculture, Bivalve mollusks, Inbreeding, Oysters, Selective breeding, Wild population.

2.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de ostras nas regiões tropicais brasileiras está ligado à domesticação de espécies nativas e ao desenvolvimento de programas de reprodução e produção de sementes em laboratórios. A ostra do mangue, *Crassostrea gasar* Dautzenberg, (1891) tem como habitat ambientes estuarinos e regiões de manguezais, onde vive fixada nas raízes do mangue ou em rochas (VARELA et al., 2007). *Crassostrea gasar* apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo na costa ocidental da África, desde o Senegal até o norte da Angola (CARPENTER; DE ANGELIS, 2016), e na América do Sul, da Guiana Francesa até o sul do Brasil (LAPÈGUE et al., 2002). Dentre as espécies nativas de ostras no Brasil, *C. gasar* (LAMARCK, 1819) e sua congênera *C. rhizophorae* (GUILDING, 1828), a *C. gasar* é a espécie mais cultivada (CHRISTO et al., 2006; NASCIMENTO, 2018), principalmente por apresentar bom desempenho zootécnico (crescimento, sobrevivência entre outros) (BALDAN; BENDHACK, 2009; GALVÃO et al., 2009; LEGAT et al., 2017; LOPES et al., 2009; PEREIRA et al., 2018), maior quantidade de carne quando comparada à espécie invasora *Crassostrea gigas* em regiões tropicais e subtropicais (BRUNETTO et al., 2020).

A expansão do cultivo de moluscos bivalves no Brasil ocorreu no início dos anos 90, por meio da produção de sementes de *C. gigas* em laboratório (*hatchery*). O programa de melhoramento de ostras para população cultivada de *C. gasar* teve início em 2006 e já conta

com dez gerações de melhoramento seletivo para crescimento. Em 2012, adicionamos a cor da concha ao programa de melhoramento. Atualmente, o programa mantém linhagens tricolores; dourado, preto e listrado, selecionado para a cor da concha e crescimento, e uma linhagem selvagem selecionada apenas para crescimento. O número médio de reprodutores utilizados em cada larvicultura para produzir as linhagens é de aproximadamente 300. As ostras fundadoras da população cultivada foram coletadas na população silvestre em diferentes pontos das regiões de Florianópolis/SC (-27.64388, -48.63462), do Baía de Paranaguá/PR (-25.53335, -48.47484) de São Francisco do Sul/SC (-26.26263, -48.68325), de Cananéia-Iguape-Peruíbe/SP (-25.08892, -48.01526) e Laguna/SC (-28.504034, -48,763073), a partir de cada desova formase uma nova população utilizada para formação de gerações futuras (SILVEIRA et al., 2011).

Programas de cultivo em aquicultura, em geral, seguem como padrão a formação de uma população base, composta de descendentes selecionados a partir de reprodutores que apresentam características de interesse, como tolerância às variações de salinidade e temperatura, além de boas taxas de crescimento (GJEDREM; BARANSKI, 2009; IN et al., 2016; XU et al., 2019). À população base geralmente não há adição de novos indivíduos oriundos de populações selvagens, visto que essa adição pode degradar os ganhos genéticos já alcançados pela população em processo de seleção, além do risco de introduzir patógenos (FRANKHAM, 1996; GJEDREM; BARANSKI, 2009; IN et al., 2016; XU et al., 2019).

Contudo, a contínua seleção artificial tem sido uma abordagem comum no cultivo de moluscos, resultando perda de variação genética (APPLEYARD; WARD, 2006; CHEN et al., 2017). Isso se deve, particularmente, a elevada fecundidade aliada à variação no sucesso reprodutivo, que podem resultar perda de diversidade genética e depressão endogâmica (LIND et al., 2009; MILLER et al., 2012; PLOUGH et al., 2016). Em programas de melhoramento genético, a depressão endogâmica compromete o ganho genético, além de tornar as linhagens mais suscetíveis devido ao surgimento de genes recessivos desinteressantes para a produção (EDING, 2002; YU; LI, 2007; ZHONG et al., 2016; XU et al., 2019; VARNEY; WILBUR 2020). Os programas de criação de ostras geralmente usam estratégias reprodutivas que evitam a endogamia para evitar perdas de diversidade genética, onde os acasalamentos de pares pai/mãe foram realizados entre indivíduos de famílias não relacionadas para manter um baixo coeficiente de co-ancestralidade (LANGDON et al. 2003; DE MELO et al. 2016).

Os níveis de diversidade genética e o tamanho efetivo populacional dos reprodutores das linhagens de criação de ostras são de extrema importância para sua sustentabilidade, e podem limitar severamente a viabilidade do cultivo (EVANS et al., 2004). Adicionalmente, as ostras nativas são muito relevantes para comunidades costeiras (GALVÃO; HILSDORF, 2015), e a

caracterização da estrutura e diversidade genética de populações selvagens são etapas fundamentais para planos de manejo adequados (SHAKLEE; BENTZEN, 1998; MILLER et al., 2012), permitindo a viabilidade desse importante recurso alimentar e econômico.

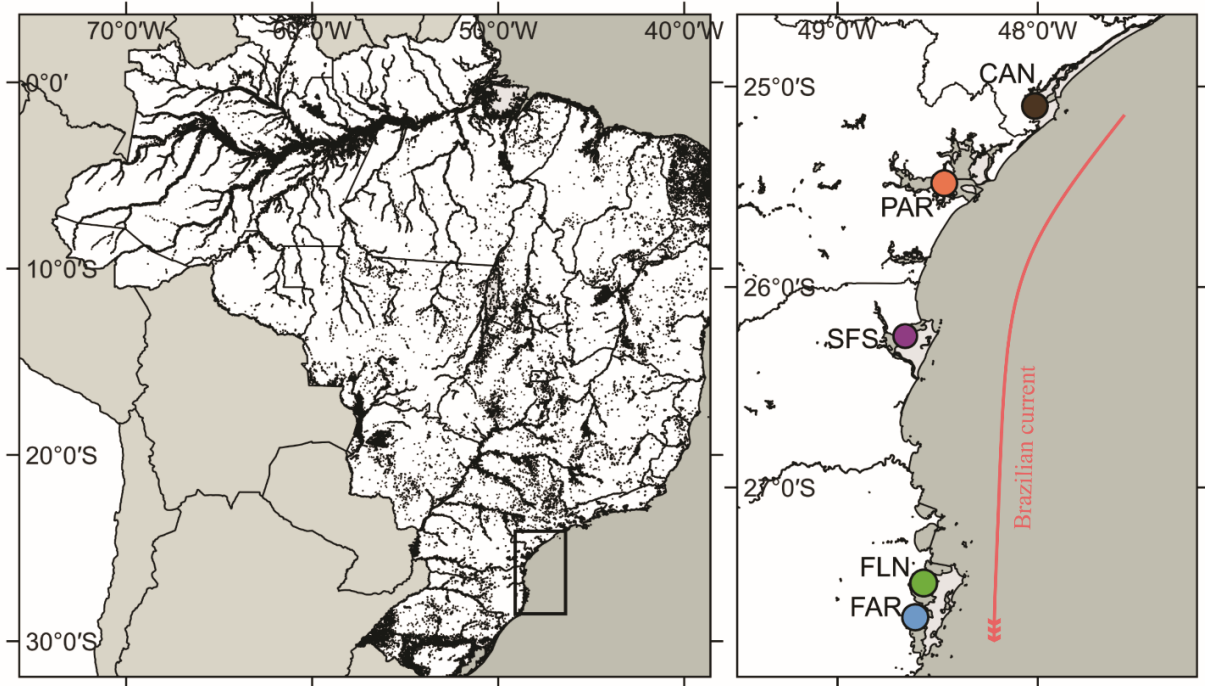
O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade e estrutura genética de *C. gasar* provenientes de populações selvagens do litoral sul e sudeste brasileiro, e inferir a composição genética do estoque de ostras produzidas em laboratório, a fim de verificar os potenciais efeitos genéticos induzidos através da reprodução seletiva através de marcadores microssatélites.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de amostra

Foram coletadas 176 ostras do gênero *Crassostrea*, sendo 35 ostras adultas do plantel de reprodutores (FAR) do Laboratório de Moluscos Marinheiros (LMM) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (-27.48834, -48.54093), e 141 exemplares de ambiente natural (Autorização para atividades com finalidade científica, Número: 70192-1 SISBIO- Código de autenticação: 0701920120190724). As ostras selvagens foram selecionadas com base no fenótipo predominante de *C. gasar*, que corresponde às ostras maiores que ultrapassam 70 mm de altura ou 40 mm de largura, com ocorrência preferencial em zonas subtidais (BOEHS et al., 2019; GALVÃO et al., 2013; IGNACIO et al., 2000). Foram amostrados indivíduos adultos de *C. gasar* em diferentes pontos amostrais nas regiões da Grande Florianópolis/SC (-27.64388, -48.63462), (FLN, n=35); da Baía de Paranaguá/PR (-25.53335, -48.47484) (PAR, n=33); de São Francisco do Sul/SC (-26.26263, -48.68325) (SFS, n=35); e da Área de Proteção Ambiental de Cananéia-Iguape-Peruíbe/SP (-25.08892, -48.01526) (CAN, n=38) (Figura 1).

Figura 1: Mapa dos locais de coleta: Laboratório de Moluscos Marinhos população de cultivo (FAR, -27.48834, -48.54093), Grande Florianópolis (FLN, -27.64388, -48.63462), Paraná (PAR, -25.53335, -48.47484), São Francisco do Sul (SFS, -26.26263, -48.68325) e Cananéia (CAN, -25.08892, -48.01526).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os indivíduos foram capturados manualmente e posteriormente sacrificados através da secção das valvas para a obtenção de amostras de tecido do músculo adutor. As amostras foram identificadas e acondicionadas em microtubos de 2mL contendo etanol 99%, e armazenadas em freezer -20°C.

2.2.2 PCR-RFLP para identificação das espécies

O DNA genômico foi extraído usando o método de tampão salino (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). As amostras foram amplificadas por meio da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase). Seguimos o protocolo de identificação de espécie descrito por Pie e colaboradores (2006). Para isso, foram utilizados os iniciadores universais 16SAR (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16SBR (5'-CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') descritos por (KESSING et al., 1989), que amplificam fragmentos em torno de 550pb.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 20µL contendo 50ng/µL de DNA, 1x solução tampão, 0,2mM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 0,2µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*), 1.0U de Taq DNA Polymerase (Recombinant Invitrogen) e água ultrapura.

O programa utilizado para as ampliações consistiu em: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por

45 segundos, 72°C por 45 minutos, extensão final de 72°C por 5 minutos e 10°C por 5 minutos, em termociclador Veriti Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific.

Os produtos de amplificação do gene 16S foram digeridos com endonucleases de restrição HaeIII (5'...GGVCC...3') em busca de polimorfismos nos sítios de restrição (gerando RFLPs) proposta por (PIE et al., 2006) para permitir a diferenciação entre *C. gasar* (235pb), *C. rhizophorae* (261pb) e *C. gigas* (395pb).

A reação de RFLP ocorreu em uma solução de final de 10µL, contendo 4,0µL do produto da PCR, 1X do buffer e 1U da enzima HaeIII (termo Scientific), conforme especificações do fabricante e água ultrapura. As amostras foram incubadas no termociclador a 37°C por 1 hora.

A visualização dos fragmentos RFLP foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com TBE 0,5X, tendo como padrão referencial 100bp DNA Ladder da marca Invitrogen, sob luz UV.

2.2.3 Amplificação de microssatélites

Vinte microssatélites foram usados para amostras identificadas com 16S de *C. gasar* (CGE11, CGB09, CGD05, CGG06, CGF03, CGH02, CGA07, CGA12 (BALDEZ et al., 2016), GASA11, GASA15, GASA9 (CAVALEIRO et al., 2013), e Cb03, Cb04, Cb05, Cb09, Cb10, Cb11, Cb14, Cb18 e Cb24 (MONTEIRO et al., 2021). As amplificações foram conduzidas com primers M13 marcados com fluorescência em sua cauda (SCHUELKE, 2000). As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 10µL, contendo 50ng de DNA, 1x PCR buffer, 1,5mM de cloreto de magnésio, 1,2mM de dNTP, 8pM de M13 *forward* (fluorescência VIC, FAM, PET ou NED), 8pM do primer *reverse*, 8pM do primer *forward*, e 1U Taq DNA polimerase (Recombinant Invitrogen).

O programa de amplificação constituiu em desnaturação a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a temperatura de anelamento (gradiente de 57°C a 66°C), 45 segundos a 72°C; 8 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos a 53°C, 45 segundos à 72°C, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram genotipados individualmente em sequenciador automático Applied Biosystems 3500xL. O tamanho dos alelos foi obtido através do programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

2.2.4 Análises estatísticas

O programa MICRO-CHECKER v2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi usado para verificar alelos nulos. O equilíbrio de ligação e o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram testados usando o programa GENEPOPv.1.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) e

GENALEX v.6.4 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004; PEAKALL; SMOUSE, 2006), respectivamente.

A estrutura genética da população foi inicialmente investigada por meio de agrupamentos bayesianos do programa STRUCTURE v.2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003). Foram utilizadas duas abordagens, os modelos de mistura e não mistura. Cada análise foi realizada com 400.000 interações de MCMC, após um período de corte inicial (burn-in) de 200.000 interações. Cada valor de K (1 a 7) foi repetido 10 vezes. O valor ideal de K foi selecionado seguindo EVANNO et al. (2005), conforme implementado no STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012). A estruturação da população também foi estimada por uma abordagem multivariada usando análise discriminante de componentes principais (DAPC; (JOMBART et al., 2010) do pacote Adegenet (JOMBART; BATEMAN, 2008), implementado no software R (R Core Team, 2017). Para todas as populações amostradas, realizamos valores de F_{st} pareados (WEIR; COCKERHAM, 1984), calculados usando o ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

O tamanho efetivo da população (N_e) para cada população foi estimado usando o programa LDNe (WAPLES, 2006; WAPLES; DO, 2008) implementado no NeEstimator v.2.0 (DO et al., 2014). Usamos a opção de modelo de acasalamento aleatório, método de equilíbrio de ligação e um valor crítico de frequência alélica de 0,02 (alelos com frequência inferior a 0,02 foram excluídos (WAPLES; DO, 2008, 2010) com intervalos de confiança (IC) paramétricos de 95%.

Para cada população amostrada foi estimada a diversidade genética pelo número de alelos (A), número efetivo de alelos (A_e), heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) usando GenAlex v. 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A riqueza alélica (LEBERG, 2002) e o coeficiente de endogamia (F_{is}) (WEIR; COCKERHAM, 1984) foram calculados para cada locus usando FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). As estimativas da riqueza alélica entre as populações amostradas foram comparadas usando um teste t pareado usando os pacotes R ggpubr v.0.6.0 KASSAMBARA, 2023).

2.3 RESULTADOS

Através da análise de PCR-RFLP, utilizando a endonuclease HaeIII, foi possível identificar as duas espécies através da visualização do gel de agarose (Figura Suplementar 1). Das 176 amostras coletadas, 166 foram identificadas como *C. gasar* e 10 *C. rhizophorae*.

Dos vinte primers testados, quatorze amplificaram e foram utilizados nas análises: CGE11, CGB09, CGD05, CGG06, CGH02 (BALDEZ et al., 2016); GASA15, GASA9 (CAVALEIRO et al., 2013) e Cb03, Cb04, Cb05, Cb09, Cb10, Cb11, Cb14 (MONTEIRO et al., 2021) (Tabela Suplementar 1).

O número de alelos (A) variou de nove (FAR) a 11 (SFS e CAN), com total de 51 alelos (média de 10,21 alelos por loco). A heterozigosidade esperada (He) variou de 0,703 (FAR) a 0,738 (FLN), com valor médio de 0,724. A heterozigosidade observada (Ho) variou de 0,574 (PAR) a 0,619 (FAR), com média geral de 0,605. A riqueza alélica (Ra) variou de 7,5 (FAR) a 9,0 (CAN), com média de 8,6.

Quando analisados individualmente, os loci GASA9 (FAR, PAR, SFS e CAN), CGD05 (PAR), CGG06 (FAR, FLN, PAR, SFS e CAN), CGB09 (FLN, PAR, SFS e CAN), CB14 (FAR, PAR e SFS) e CB10 (FAR, FLN, PAR, SFS e CAN) apresentaram déficit de heterozigotos (valores positivos e significativos de Fis) para os indivíduos dos grupos amostrais. Foram encontrados alelos nulos em seis *loci* nas populações de FAR, SFS e CAN e sete *loci* nas populações de FLN e PAR.

A população de cultivo (FAR) apresentou 17 alelos com menor frequência alélica em sete dos quatorze *loci* estudados (CGB09, CGG06, CB09, CGE11, CGD05, CB05 e GASA9), e 25 alelos apresentaram maior frequência em 11 loci (CGB09, CGG06, CGH02, CB09, CGE11, CGD05, CB05, GASA9, CB03, CB14 E CB10), além de apresentar dois alelos exclusivos em dois loci (CGD05 e CB09) com frequência alélica de 0,014 e 0,015 respectivamente (Figura Suplementar 2).

Tabela 1: Caracterização dos quatorze *loci*, por grupos amostrais de *Crassostrea gasar*; número de alelos (A), número de alelos efetivos (Ae), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), riqueza alélica (Ra), índice de fixação Fis), Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{EHW}) e alelos nulos (AN). Cultivo (FAR), Grande Florianópolis (FLN), Paraná (PAR), São Francisco do Sul (SFS) e Cananéia (CAN). Os asteriscos denotam valores significativos, $p < 0,05$.

FAR (N=35)								
Loci	A	Ae	Ho	He	Ra	Fis	P_{EHW}	AN
GASA9	3	2,29	0,286	0,564	3,0	0,504*	0,000*	Sim
GASA15	1	1,00	0,000	0,000	1,0	NA	NA	Não
CGD05	16	10,47	0,886	0,904	13,1	0,035	0,041*	Não
CGH02	14	9,839	0,714	0,898	12,1	0,219	0,018*	Sim
CGG06	15	8,57	0,636	0,883	12,0	0,294*	0,000*	Sim
CGB09	17	8,87	0,743	0,887	13,5	0,177	0,001*	Sim
CGE11	12	4,55	0,839	0,780	9,4	-0,058	0,678	Não
CB03	7	3,11	0,686	0,679	5,9	0,004	0,243	Não
CB11	5	3,93	0,914	0,746	4,7	-0,212*	0,000*	Não
CB05	9	5,82	0,788	0,828	7,8	0,064	0,498	Não
CB09	11	4,28	0,882	0,767	9,0	-0,136	0,558	Não
CB04	3	1,56	0,343	0,359	2,5	0,059	0,717	Não
CB14	7	5,01	0,571	0,800	6,5	0,299*	0,002*	Sim
CB10	5	3,93	0,371	0,746	4,9	0,513*	0,000*	Sim
Média	9	5,23	0,619	0,703	7,5	0,135*		
FLN (N=33)								
Loci	A	Ae	Ho	He	Ra	Fis	P_{EHW}	AN
GASA9	5	2,65	0,394	0,624	4,0	0,381*	0,002*	Sim
GASA15	2	1,06	0,061	0,059	1,8	-0,016	1,000	Não
CGD05	15	10,83	0,758	0,908	12,7	0,18*	0,001*	Sim
CGH02	14	8,31	0,879	0,880	11,7	0,016	0,312	Não
CGG06	18	13,87	0,321	0,928	15,7	0,664*	0,000*	Sim
CGB09	24	16,86	0,710	0,941	18,9	0,261*	0,000*	Sim
CGE11	15	8,89	0,968	0,888	12,7	-0,074	0,013*	Não
CB03	7	3,47	0,545	0,713	6,2	0,249*	0,016*	Sim
CB11	7	4,39	0,848	0,772	6,2	-0,083	0,001*	Não
CB05	10	6,81	0,839	0,853	9,2	0,033	0,716	Não
CB09	13	6,42	0,939	0,844	11,1	-0,097	0,726	Não
CB04	3	1,65	0,375	0,394	2,9	0,064	0,647	Não
CB14	7	4,59	0,548	0,783	6,3	0,314*	0,014*	Sim
CB10	6	3,96	0,303	0,747	5,8	0,604*	0,000*	Sim
Média	10	6,70	0,606	0,738	8,9	0,194*		
PAR (N=29)								
Loci	A	Ae	Ho	He	Ra	Fis	P_{EHW}	AN
GASA9	7	2,95	0,172	0,661	5,8	0,747*	0,000*	Sim
GASA15	2	1,07	0,069	0,067	1,8	-0,018	1,000	Não
CGD05	15	10,38	0,714	0,904	13,2	0,227*	0,002*	Sim
CGH02	13	8,96	0,821	0,888	11,3	0,093	0,056	Não
CGG06	16	13,15	0,400	0,924	14,8	0,581*	0,000*	Sim
CGB09	23	16,20	0,667	0,938	18,8	0,307*	0,000*	Sim
CGE11	13	7,77	0,923	0,871	11,4	-0,04	0,454	Não
CB03	5	2,54	0,621	0,608	4,5	-0,004	0,076	Não
CB11	6	4,68	0,931	0,787	5,9	-0,167*	0,000*	Não
CB05	11	8,14	0,923	0,877	10,1	-0,033	0,957	Não
CB09	11	5,68	0,679	0,824	9,7	0,194*	0,015*	Sim
CB04	4	1,69	0,500	0,409	3,2	-0,204	0,187	Não
CB14	7	4,75	0,357	0,790	6,6	0,560*	0,000*	Sim
CB10	5	3,80	0,259	0,737	5,0	0,659*	0,000*	Sim
Média	10	6,56	0,574	0,735	8,7	0,236*		
SFS (N=34)								
Loci	A	Ae	Ho	He	Ra	Fis	P_{EHW}	AN

GASA9	6	3,07	0,353	0,675	4,9	0,488*	0,000*	Sim
GASA15	1	1,00	0,000	0,000	1,0	NA	NA	Não
CGD05	17	11,85	0,941	0,916	14,0	-0,013	0,670	Não
CGH02	15	8,56	0,971	0,883	11,6	-0,084	0,888	Não
CGG06	20	14,42	0,515	0,931	16,0	0,459*	0,000*	Sim
CGB09	27	21,14	0,788	0,953	20,5	0,188*	0,001*	Sim
CGE11	14	8,25	0,900	0,879	11,9	-0,007	0,343	Não
CB03	6	2,70	0,647	0,630	4,8	-0,012	0,716	Não
CB11	7	2,70	0,844	0,630	5,6	-0,325*	0,066	Não
CB05	10	7,15	0,824	0,860	9,4	0,058	0,495	Não
CB09	12	5,08	0,765	0,803	9,5	0,063	0,138	Não
CB04	5	1,85	0,324	0,462	4,4	0,313*	0,003*	Sim
CB14	7	4,96	0,545	0,798	6,4	0,331*	0,001*	Sim
CB10	5	2,57	0,219	0,611	4,8	0,651*	0,000*	Sim
Média	11	6,81	0,617	0,716	8,9	0,154*		
CAN (N=35)								
Loci	A	Ae	Ho	He	Ra	Fis	PEHW	AN
GASA9	8	3,38	0,429	0,704	5,9	0,404*	0,001*	Sim
GASA15	2	1,15	0,143	0,133	2,0	-0,063	1,000	Não
CGD05	17	11,50	0,800	0,913	13,8	0,138	0,000*	Sim
CGH02	18	10,65	0,914	0,906	13,9	0,005	0,883	Não
CGG06	15	10,50	0,471	0,905	15,0	0,503*	0,000*	Sim
CGB09	27	16,89	0,657	0,941	18,9	0,315*	0,000*	Sim
CGE11	13	7,61	0,786	0,869	11,5	0,113	0,0226*	Não
CB03	8	3,39	0,600	0,705	6,4	0,163	0,085	Não
CB11	4	2,36	0,829	0,578	3,9	-0,423*	0,005*	Não
CB05	13	7,38	0,771	0,864	10,4	0,122*	0,097	Não
CB09	12	6,06	0,914	0,835	9,5	-0,08	0,861	Não
CB04	5	1,64	0,387	0,392	3,9	0,03	0,488	Não
CB14	7	4,50	0,594	0,778	6,9	0,252*	0,000*	Sim
CB10	5	3,33	0,242	0,700	4,5	0,662*	0,000*	Sim
Média	11	6,46	0,610	0,730	9,0	0,181*		

Fonte: Elaborado pelo autor. CGE11, CGB09, CGD05, CGG06 e CGH02 (Baldez et al., 2016); GASA15 e GASA9 (Cavaleiro et al., 2013) e Cb03, Cb04, Cb05, Cb09, Cb10, Cb11 e Cb14 (GenBank #MZ385602 - #MZ385610).

Alelos privados foram observados em 13 dos 14 *loci* utilizados (CGE11, CGB09, CGD05, CGG06, GASA9, Cb03, Cb04, Cb05, Cb09, Cb10, Cb11 e Cb14), totalizando 33 alelos privados. Todas as populações apresentaram alelos privados, com destaque para as populações selvagens que apresentaram maiores número de alelos privados em relação à população de cultivo, FLN (oito alelos), SFS (sete alelos) e CAN (13 alelos), PAR (três alelos). Já a população de cultivo FAR apresentou apenas dois alelos) Tabela 2.

Tabela 2: Frequência alélica dos quatorze *loci*, por grupos amostrais de *Crassostrea gasar*. Cultivo (FAR), Grande Florianópolis (FLN), Paraná (PAR), São Francisco do Sul (SFS) e Cananéia (CAN).

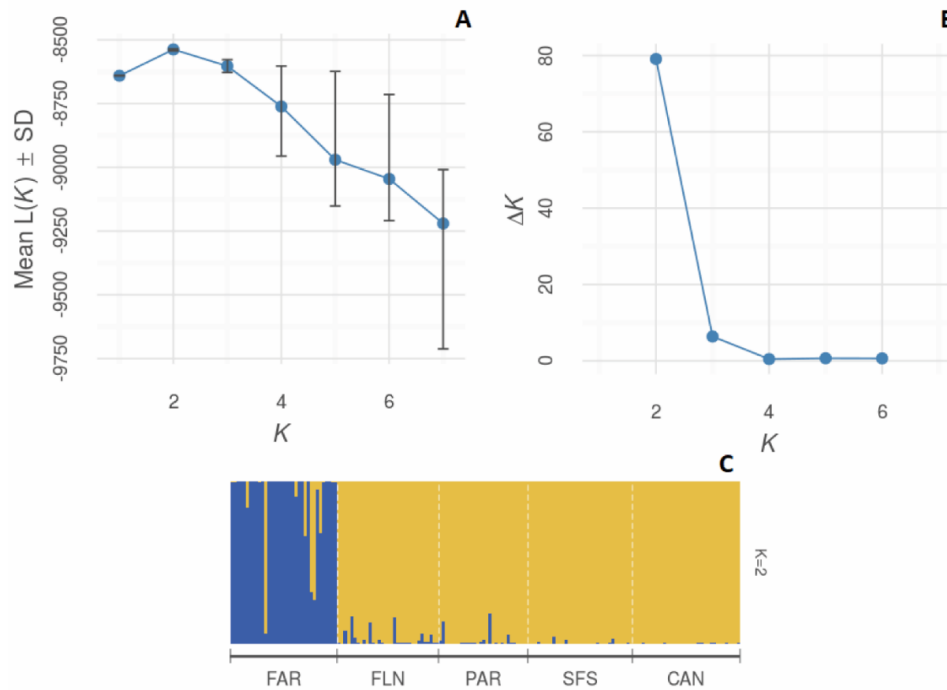
Grupo	Locus	Alelo	Frequência alélica
FAR	CGD05	414	0,014
FAR	CB09	218	0,015
FLN	CGG06	208	0,054
FLN	CGB09	338	0,016
FLN	CGB09	402	0,032
FLN	CGB09	404	0,016
FLN	CGE11	176	0,016
FLN	CB11	211	0,015
FLN	CB09	222	0,015
FLN	CB10	234	0,030
PAR	CGG06	260	0,040
PAR	CGE11	174	0,019
PAR	CB14	272	0,018
SFS	CGH02	250	0,015
SFS	CGG06	220	0,030
SFS	CGG06	266	0,015
SFS	CGB09	350	0,030
SFS	CGB09	356	0,015
SFS	CB11	219	0,016
SFS	CB04	146	0,029
CAN	GASA9	346	0,029
CAN	CGD05	454	0,014
CAN	CGH02	220	0,014
CAN	CGH02	256	0,014
CAN	CGB09	340	0,014
CAN	CGB09	412	0,014
CAN	CGE11	182	0,018
CAN	CB03	250	0,014
CAN	CB05	239	0,014
CAN	CB05	246	0,014
CAN	CB09	224	0,014
CAN	CB04	128	0,016
CAN	CB04	160	0,016

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nenhuma diferença significativa entre as médias populacionais para a riqueza de alelos foi encontrada usando um teste t pareado: FAR x FLN (valor $p = 0,425$), FAR x PAR (valor $p = 0,490$), FAR x SFS (valor $p = 0,452$), CAN x FAR (valor $p = 0,396$), FLN x PAR (valor $p = 0,908$), FLN x SFS (valor $p = 0,990$), CAN x FLN (valor $p = 0,961$), PAR x SFS (p-valor = 0,921), CAN x PAR (p-valor = 0,869) e CAN x SFS (p-valor = 0,953). A análise de atribuição bayesiana, sem informação a priori, indicou a existência de dois grupos genéticos ($K=2$), um formado pela população de cultivo e outro pelos indivíduos selvagens (Figura 2). A média das probabilidades $\ln P(K)$ e seu desvio padrão do gráfico de probabilidade a posteriori para populações selvagens de *C. gasar*. não detectou estrutura genética (Figura Suplementar 3). Análise do STRUCTURE com informação a priori ($K= 1$ a 7) (Figura Suplementar 4). O mesmo padrão de estruturação com esses dois agrupamentos genéticos principais também foi detectado pela análise DAPC (Figura 3). Apesar da população de cultivo FAR estar separada das demais,

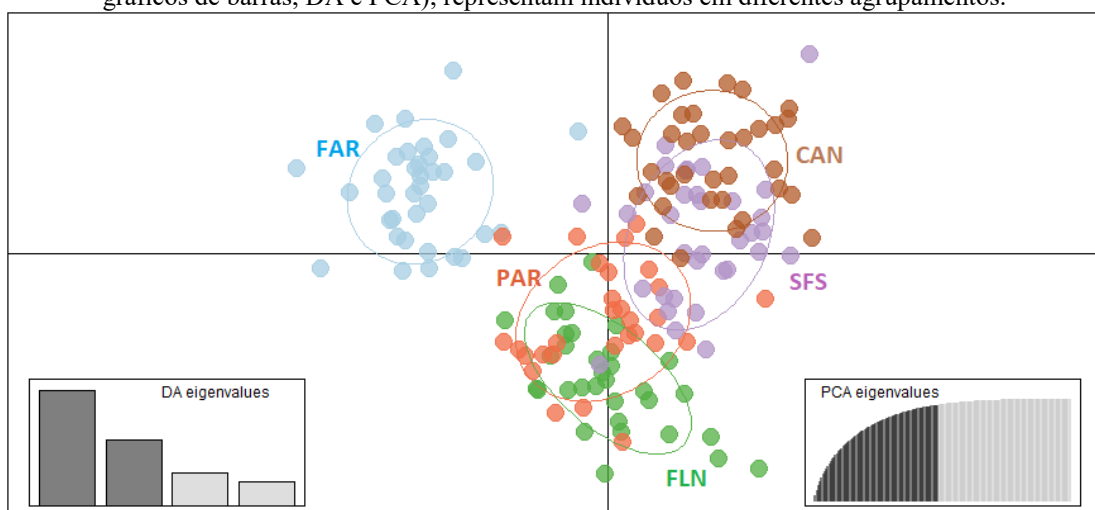
é possível observar uma sobreposição entre os indivíduos selvagens dos diferentes pontos amostrais, correspondentes com sua distribuição geográfica (Figura 3).

Figura 2: Estrutura genética da população do valor delta K estimado. (A) Média das probabilidades $\ln P(K)$ e seu desvio padrão de probabilidade posterior; (B) O gráfico Delta K determinou o valor máximo em $K = 6$, (C) Resultados de agrupamento para $K=2$ de *Crassostrea gasar* obtidos por meio de análise bayesiana. Os indivíduos são representados como colunas e as linhas brancas demarcam os grupos amostrais, resultado foi obtido no software STRUCTURE.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3: Representação da análise discriminante de componentes principais (DAPC) em um gráfico tipo *ScatterPlot* para agrupamento dos grupos amostrais cultivo (FAR) e populações selvagens: Grande Florianópolis (FLN), Paraná (PAR), São Francisco do Sul (SFS) e Cananêia (CAN). Probabilidades de pertencimento (em gráficos de barras, DA e PCA), representam indivíduos em diferentes agrupamentos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores de diferenciação genética par-a-par (F_{st}) refletiram os resultados obtidos pelo DAPC e STRUCTURE. Em todas as combinações par-a-par entre a população FAR com as selvagens, os valores foram significativos e maiores que os observados na comparações par-a-par entre as populações amostrais coletadas em ambiente natural, com valores de F_{st} entre 0,015 (FAR vs. FLN) e 0,035. (CAN vs. FAR). A diferenciação genética entre populações selvagens foi significativa apenas para FLN vs. CAN ($F_{st} = 0,016$) (Tabela 3).

Tabela 3: Diferenciação genética estimada pelo índice de fixação (F_{st}) dos grupos amostrais de *C. gasar*. Valores de F_{st} par-a-par calculados entre cinco populações diferentes. Valores significativos de F_{st} estão apresentados em asterisco. Cultivo (FAR), Grande Florianópolis (FLN), Paraná (PAR), São Francisco do Sul (SFS) e Cananéia (CAN). p =nível nominal indicativo ajustado (5%), comparações múltiplas $p=0,005$.

GRUPOS	FAR	FLN	PAR	SFS
FAR				
FLN	0,015*			
PAR	0,018*	0,002		
SFS	0,033*	0,008	0,007	
CAN	0,035*	0,016*	0,005	0,004

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tamanho efetivo da população (N_e) mostrou que os valores foram estimados em $N_e = 320$ (95% CI 126,5–infinito) na população FAR, $N_e = 360$ (95% CI 143,6–infinito) em FLN, $N_e = \text{infinito}$ (95% CI 347,6–infinito) em PAR, $N_e = 1232,8$ (95% CI 201–infinito) em SFS e $N_e = 1847,3$ (95% CI 192,9–infinito) em CAN.

2.4 DISCUSSÃO

As comparações genéticas espaciais revelaram a existência de dois principais grupos genéticos de *C. gasar*, um formado pela população proveniente de cultivo (FAR) e um outro grupo, composto pelas populações selvagens de diferentes pontos do litoral Sul (FLN, PAR, SFS) e Sudeste do Brasil (CAN).

A maior diferenciação detectada, entre a população FAR e as populações selvagens, ocorre provavelmente devido às características de cultivo e seleção dessa população em laboratório. A população de cultivo foi formada em 2006 com dez gerações de reprodução seletiva para crescimento, a partir de aproximadamente 300 indivíduos originários das populações selvagens FLN, PAR, SFS e CAN. O processo de cultivo em laboratório foi conduzido pela mistura desses indivíduos, com desova com *pool* de sêmen e seleção em massa para caracteres de crescimento e sobrevivência. Considerando as características desse processo de cultivo, seleção e melhoramento genético, que tem como objetivo a seleção e fixação de

caracteres de interesse, ocorre a alteração da frequência de alguns alelos (MATEUS et al., 2004; GJEDREM; BARANSKI, 2009), diferenciando a população de cultivo das demais, das quais foi fundada.

Apesar de populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* ocorrerem naturalmente em ecossistemas estuarinos e manguezais (GALVÃO et al., 2000; CHRISTO et al., 2006; VARELA et al., 2007), e serem sésseis durante a maior parte da vida, as ostras possuem extensos períodos larvais pelágicos, permitindo sua dispersão por centenas ou milhares de quilômetros (PALUMBI, 1994; SHANKS et al., 2003; SHANKS, 2009; HELLBERG et al., 2002). Apesar da ausência de estrutura genética entre populações selvagens, é possível observar um gradiente de distribuição na análise do DAPC, coerente com a distribuição geográfica dos mesmos, contudo, insuficiente para diferenciá-los geneticamente. Nas comparações par-a-par, somente os indivíduos de Paranaguá (PAR) e Florianópolis (FLN) apresentaram estruturação genética significativa, contudo, com baixos valores de diferenciação. A dispersão larval durante o período pelágico de *C. gasar* dura em média três semanas, que associada às correntes oceânicas possivelmente permitem conectividade entre essas populações. O fluxo de ostras na fase larval permite que ostras de distintos lugares possam se fixar e realizar deste modo, o fluxo gênico impedindo a estruturação dessas populações na região Sul e Sudeste do Brasil. Um estudo realizado por Silva (2015) em três estuários no estado de Sergipe, na região Nordeste do Brasil, mostrou baixa estruturação para *C. gasar* nos locais de coleta analisados, demonstrando que a espécie tem alta capacidade de dispersão. Um estudo anterior relatou conectividade genética limitada, isolamento por distância e o efeito de barreiras oceanográficas em espécies de ostras do Atlântico, incluindo *C. gasar* (LAZOSKI et al., 2011).

Considerando a falta de estruturação genética das populações selvagens, o intercâmbio entre os indivíduos entre os pontos amostrais não acarretaria prejuízos genéticos para as populações. Contudo, levando em consideração os aspectos biológicos, o intercâmbio destes indivíduos sem a verificação da presença de parasitas ou doenças nas distintas populações pode afetá-las negativamente. Informações disponíveis sobre a estruturação genética de populações de ostras ainda são escassas, inviabilizando o desenvolvimento de políticas de proteção e manejo desses recursos genéticos, o que torna estudos de diversidade genética e estrutura populacionais extremamente relevantes.

O processo de seleção e de deriva genética da população de cultivo (FAR) ficou evidente em todas as análises de diversidade, que apresentou um menor número de alelos privados em comparação às populações selvagens (KOCHMANN et al., 2012). O processo de seleção e de deriva genética também foi responsável pela alteração na frequência alélica da população FAR,

que se destacou pelo menor número de alelos em sete dos quatorze loci estudados, e, por outro lado, pela maior frequência, além de dois exclusivos.

Apesar do processo artificial de reprodução da população de cultivo, o nível de diversidade foi semelhante entre todas as populações. De maneira geral, os níveis de heterozigosidade esperados em populações de ostras *Crassostrea* geralmente são elevados, mesmo em populações de cultivo, como observado para populações de cultivo de *C. gigas* na Austrália (MILLER et al., 2012) e *Crassostrea virginica* nos Estados Unidos (CARLSSON et al., 2006). Assim como os demais índices de diversidade genética, o valor médio da riqueza alélica da população de cultivo foi inferior às populações selvagens, e inferiores em comparação com outras espécies de *Crassostrea*, como de *C. gigas* (MILLER et al., 2012) e *C. virginica* (CARLSSON et al., 2006). Os menores valores de diversidade genética de populações selvagens de *C. gasar*, em comparação com outras espécies, pode estar relacionada à característica da espécie. Alguns estudos como de Melo et al. (2012) analisaram uma população nativa no Pará (Norte do Brasil), e encontraram valores de H_e médio de 0,854 (0,665 a 0,936). Baldez et al. (2016) analisaram uma única população selvagem de *C. gasar* no nordeste brasileiro e identificaram H_e média 0,578 (H_e de 0,622 a 0,941), sustentando a hipótese de os valores relativamente médios, característico da espécie.

A despeito da seleção em massa na população de cultivo, os valores de diversidade genética permanecem relativamente elevados, indicando que se trata de uma população geneticamente viável. O tamanho populacional efetivo também apresentou valores elevados, com o menor valor para a população de cultivo ($N_e = 320$) e valor infinitamente grande para a população de Paranaguá (PAR). Os índices de fixação (F_{is}), foram positivos para todas as populações, indicando déficit de heterozigotos, provavelmente sendo uma característica da espécie, além do, mas as populações estudadas sofrem pressão antrópica por estarem localizadas em regiões densamente povoadas, com atividades portuárias, industriais, lazer, urbanização e a implantação de infraestrutura de transportes, energia e saneamento.

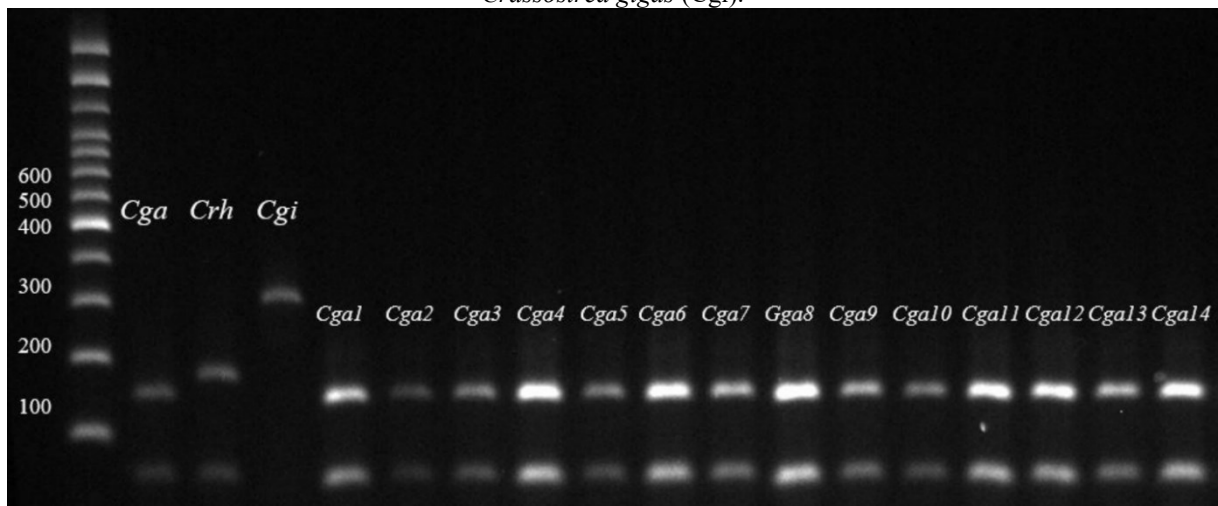
A perda de variação genética é um fenômeno comum em programas de seleção em massa, particularmente em moluscos (APPLEYARD; WARD, 2006). No entanto, a população cultivada analisada não apresentou redução na diversidade genética, conforme corroborado pelo teste t pareado para riqueza alélica. Além do isolamento genético em relação às populações de cultivo, reduzindo assim o fluxo gênico, o menor tamanho efetivo e a seleção no processo reprodutivo em laboratório tendem a selecionar alguns alelos e fixar outros, reduzindo assim a diversidade genética e elevando os coeficientes de endocruzamento, sem monitoramento e acompanhamento genético. A redução da variabilidade genética pode ser maléfica para a

população de cultivo a longo prazo, comprometendo a viabilidade do cultivo (MATEUS et al., 2004; GJEDREM; BARANSKI, 2009). A drástica redução da diversidade genética pode tornar as populações vulneráveis à doenças e fatores ambientais aos quais não foram adaptadas ao longo das gerações (MATEUS et al., 2004; GJEDREM; BARANSKI, 2009). A população cultivada não apresentou redução na diversidade por ser um cultivo relativamente jovem, e os esforços para manter um manejo adequado evitando a reprodução de indivíduos aparentados.

Este é o primeiro estudo que avalia a diversidade e estrutura genética de *C. gasar* selvagem e certamente servirá de base para o monitoramento da diversidade de populações naturais e cultivadas. A preservação da diversidade genética em populações naturais e de cultivo garante a conservação e a exploração do potencial genético das espécies aquáticas. Deste modo, o monitoramento da população de cultivo e o estabelecimento de valores de referência de diversidade genética permitirão adotar estratégias, tanto para a viabilidade da população de cultivo, como para tomadas de decisão sobre o manejo das populações selvagens.

2.5 MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura Suplementar 1: Gel de agarose (1,5%) evidenciando a diferença de tamanho entre os fragmentos de 16S com a utilização da endonuclease HaeIII. Padrões *Crassostrea gasar* (Cga), *Crassostrea rhizophorae* (Crh) e *Crassostrea gigas* (Cgi).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela Suplementar 1: Tabela. Nome locus, Sequência dos primers, Repetição *motif*, Temperatura de anelamento (Ta(°C)), Tamanho (pb), Número de alelos (A), Autor e Número de Acesso GenBank. ¹ Valores de referência na literatura, * Valores obtidos para *Crassostrea gasar*. Não amplificado (Na) e não informado (N.I.).

Nome Locus	Sequência dos Primers (5' - 3')	Repetição <i>motif</i>	Ta (°C)	Tamanho (pb)	Nº de alelos (A)	Autor	Fluorescência dyes	Acesso GenBank	
GASA15	ACAACATTGGTCTTTTGTGGCT AGCGAGTGTTTGTAAGGAGGAG	(ACA) ⁴	60	276-300	3	2	Cavaleiro et al. (2013)	VIC	KC335529
CGE11	GTAAGTGTA AACGTC TTTGGCTGTC TAGTGCAACCCGTTTATATGACT	(GT)4CG(GT)2GC(GT) ⁹	60	180-202	10	19	Baldez et al. (2016)	VIC	
CGB09	CAGCGAGTCTTAGCAATCTCTC GGCTATGGGAGTCTCGATATAGG	(CT)16TT(CT)7(GT)17GG(CA) ⁸	60	358-410	12	35	Baldez et al. (2016)	FAM	
CGD05	TAGTCGATCGATCTCTCGTTCC TAGCCGTCTTTGACCAGTATCG	(TG)11(AG)21	60	408-450	15	20	Baldez et al. (2016)	FAM	
CGG06	CCGTTAAGGTGCCATATACTGC GTAAGAAAGTGGTCGGGAGTAA	(TC)3TT(TC)22(C)10(CA) ⁷	60	206-286	21	27	Baldez et al. (2016)	FAM	
GASA9	TGTTAGGTTTGTAGGTGACTG GACGTGGTCTACTGTCTGAG	(GTT)10	54	329-350	5	9	Cavaleiro et al. (2013)	FAM	KC335528
CGH02	AGCGTCTTTACGAGTTTGTTC AGATGAAGACGTCACCGTTACAG	(GT)14	60	222-250	13	19	Baldez et al. (2016)	VIC	
CGF03	AAAGGTGAGATGATCGTAGGAG CGCGTGGACTAACTAAGACAACAG	(GT)8	64	400-452	Na	6	Baldez et al. (2016)		
GASA11	GGCTGCACATTTCTATTCCAG AAAGTCTAATCACGGTCAACCC	(CT)32	60	235-305	Na	19	Cavaleiro et al. (2013)		KC335531
CGA12	CTTGATGCCGACCACTGTAATA TTACCTTGTGTGAGGAGAGGTC	(CA) ⁹	51	180-188	Na	5	Baldez et al. (2016)		
CGA07	GATACTCTCGCTCTCACAGATT TCGGGTGGGTAATTTAGAGGTA	(CT)23	52,5	164-180	Na	8	Baldez et al. (2016)		

Continuação Tabela suplementar 1:

Nome Locus	Sequência dos Primers (5' - 3')	Repetição motif	Ta (°C)	Tamanho (pb)	Nº de alelos (A)	Autor	Fluorescência dyes	Acesso GenBank
Cb03	TGCTCTCACTGCTGACG CCATATTTTGCCCATATCC	(CT)11	60	192-280	8	Monteiro et al.(2021)	VIC	MZ385602
Cb04	TTGGGAATGTGTGAGATGG CCTAAGTTCCTCAAATCATGG	(TA)6	60	138-186	5	Monteiro et al.(2021)	FAM	MZ385603
Cb05	TCTGTCTTGTGGGATGC CGGGGATGAAATCTTATGC	(AC)12	60	192-288	13	Monteiro et al.(2021)	PET	MZ385604
Cb09	GGCATTGTGGAGAGATTTGG CCTCGCCCTCATAGAAAGG	(CA)12	60	183-279	15	Monteiro et al.(2021)	NED	MZ385605
Cb10	CTGTTCTCAAACCAGATACGG TTTCCGACTGGTTAAAGG	(GA)6	60	213-261	8	Monteiro et al.(2021)	FAM	MZ385606
Cb11	AACCAACGCAATAATAGACG ACTTCCCATCCTCAGATCC	(TAA)5	60	168-258	4	Monteiro et al.(2021)	VIC	MZ385607
Cb14	ACTGGAGAAA TCTACCACAGG TCCTTAGCATA TCGTAAACAGG	(TAT)4	60	229-301	16	Monteiro et al.(2021)	FAM	MZ385608
Cb18	CCAGTGACAAA CTTTTCTTCG CGGGTCA GTACATTTGG	(TTA)5	60	169-259	5	Monteiro et al.(2021)		MZ385609
Cb24	TCATTCCATCATAAA TCAGG TAGTTGTCGGCATGTTCC	(TTTG)3	60	183-279	7	Monteiro et al.(2021)		MZ385610

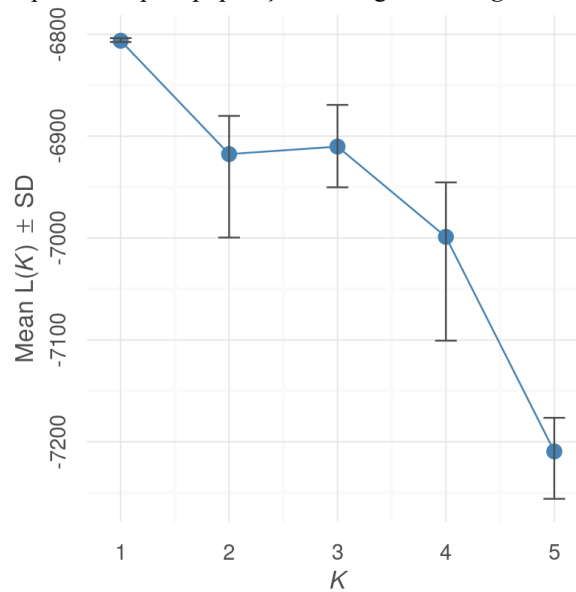
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura Suplementar 2: Frequência alélica, por loci e ponto amostral Cultivo (FAR), Grande Florianópolis (FLN), Paraná (PAR), São Francisco do Sul (SFS) e Cananéia (CAN). (-) menor frequência alélica, (+) maior frequência alélica, (*) perda de alelo e (↓) alelo exclusivo.



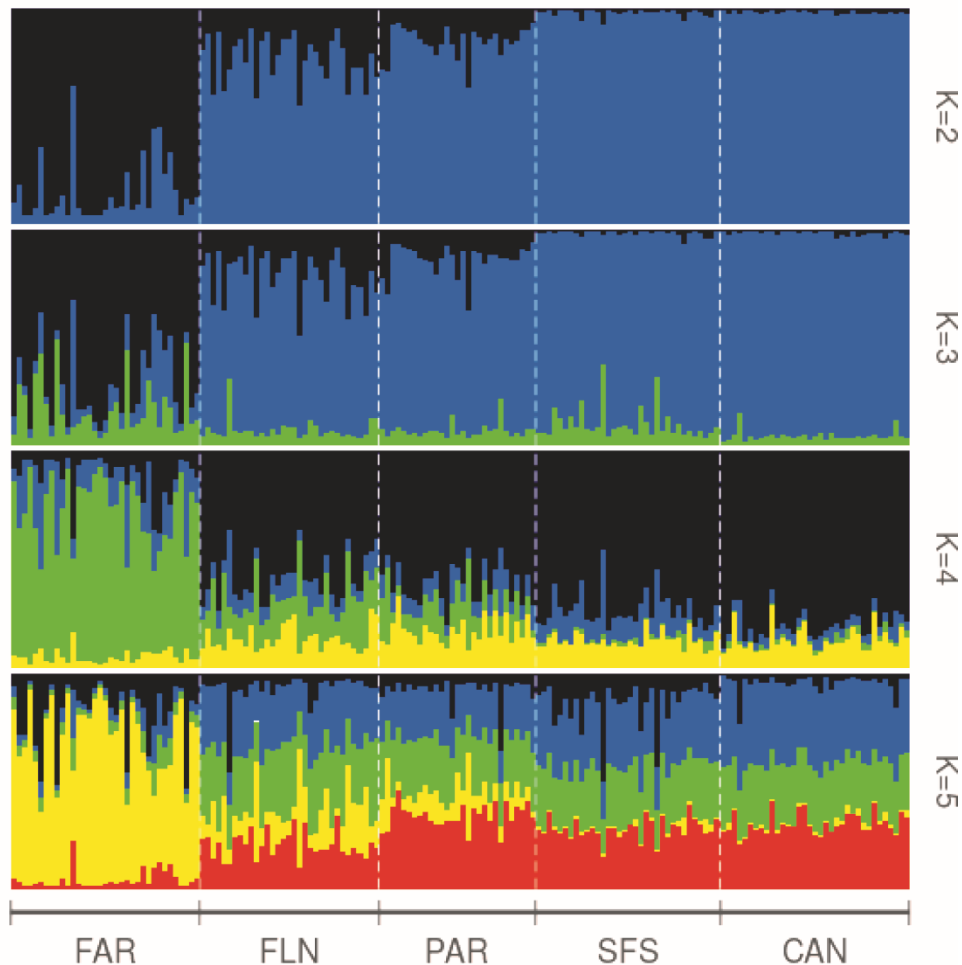
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura Suplementar 3: Média das probabilidades $\ln P(K)$ e seu desvio padrão do gráfico de probabilidade a posteriori para populações selvagens de *C. gasar*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura Suplementar 4: Estrutura genética populacional do valor delta K estimado de *Crassostrea gasar*. Resultados de agrupamento para K=2 a K=5 de *C. gasar* obtidos por análise bayesiana. Os indivíduos são representados como colunas e as linhas brancas demarcam os grupos amostrais. Cultivo (FAR), Florianópolis (FLN), Paraná (PAR), São Francisco do Sul (SFS) e Cananéia (CAN).



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.6 REFERÊNCIAS

- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- PPLEYARD, S. A.; WARD, R. D. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 148-159, 2006.
- BALDAN, A. P. et al. Sustainable mariculture in Paraná coast, Brazil: updates and perspectives. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, n. 4, p. 491-497, 2009.
- BALDEZ, R. S. C. et al. Novel Microsatellite Markers for Brazilian Mangrove Oysters (*Crassostrea gasar*) and their Cross-Amplification in *Crassostrea rhizophorae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-10, 2016.

- BOEHS, G. et al. Molecular identification of cryptic species of oysters (Genus *Crassostrea* Sacco, 1897) in the Northeast Atlantic coast of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, 2019.
- BRUNETTO, L. J. et al. The effect of density on the cultivation of the native mangrove oyster *Crassostrea tulipa* (Lamarck, 1819). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 48, n. 5, p. 855-868, 1 nov. 2020.
- CARPENTER, K. E.; DE ANGELIS, N. The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 1: Introduction, mollusks, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes and chimaeras. Rome: **FAO**. 2016.
- CAVALEIRO, N. P. et al. Polymorphic microsatellite loci for two Atlantic oyster species: *Crassostrea rhizophorae* and *C. gasar*. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 12, p.7039-7043, 2013.
- CHEN, N. et al. Weiwei. Effects of artificial selection practices on loss of genetic diversity in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 9, p. 4923-4933, 24 mar. 2017.
- CHRISTO, S. W. et al. Descrição alimentar e estágio de maturação de *Crassostrea brasiliiana* comercializadas no mercado municipal de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science And Technology**, v. 19, n. 2, p. 1-2, 4 ago. 2016.
- CARLSSON, J. et al. Evaluating recruitment contribution of a selectively bred aquaculture line of the oyster, *Crassostrea virginica* used in restoration efforts. **Journal of Shellfish Research**, v. 27, n. 5, p. 1117-1124, 2008.
- DAUTZENBERG. Mémoires de la Société zoologique de France. **Au Siege de la Société**, Paris, (1891).
- DE MELO, C. M.R. et al Improvements in desirable traits of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, as a result of five generations of selection on the West Coast, USA. **Aquaculture**, v. 460, p. 105-115, 2016.
- DO, C. et al. NeEstimatorv2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (ne) from genetic data. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 1, p. 209-214, 31 ago. 2014.
- EARL, D.A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. **Springer Nature**, v. 4, n. 2, p.359-361, 13 out. 2011.
- EDING, H. Conservation of genetic diversity: assessing genetic variation using marker estimated kinships. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – **Department of Animal Sciences, Wageningen University**, Wageningen. 79f, 2002.
- EVANNO, G. et al. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p.2611-2620, jul. 2005.

EVANS, F. et al. The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 230, n. 1-4, p. 89-98, fev. 2004.

EXCOFFIER, L. et al. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under linux and windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 6 abr. 2010.

FALUSH, D. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.

FRANKHAM, R. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. **Conservation Biology**, v. 10, n. 6, p. 1500-1508, dez. 1996.

GALVÃO, M. S. N. et al. Performance of juvenile culture of the mangrove oyster *Crassostrea* sp. in suspended lanterns in subtidal zone of the Cananéia estuary and Itaguá bay, Ubatuba (São Paulo state, Brazil). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2009.

GALVÃO, M. S. N.; HILSDORF, A. W. S. Assessing the genetic diversity of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia, Ostreidae) by microsatellite markers in southeastern Brazil. **Marine Biology Research**, v. 11, n. 9, p. 944-954, 7 ago. 2015.

GALVÃO, M. S. N. et al. Aspectos Reprodutivos da Ostra *Crassostrea brasiliiana* de Manguezais do Estuário de Cananéia, Sp (25°S; 48°W). 2000.

GALVÃO, M. S. N. et al. Molecular identification and distribution of mangrove oysters (*Crassostrea*) in an estuarine ecosystem in Southeast Brazil: implications for aquaculture and fisheries management. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 10, p. 1589-1601, 2013.

GJEDREM, T.; BARANSKI, M. Selective breeding in aquaculture: An introduction. **Springer**, 221, 2009.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3) 2002.

HELLBERG, M. E. et al. Genetic assessment of connectivity among marine populations. **Bulletin of Marine Science**, v. 70, n. 1, p. 273-290, 2002.

IGNACIO, B. L. et al. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v. 136, p. 987-991, 2000.

IN, V. et al. Can genetic diversity be maintained across multiple mass selection lines of Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata* despite loss within each? **Aquaculture**, v. 454, p. 210-216, mar. 2016.

KASSAMBARA, A. ggpubr R Package: ggplot2-based publication ready plots. *Datanovia* 1–188, 2003.

KESSING, B. et al. The simple fool's guide to PCR. **University of Hawaii, Honolulu**, p. 17, 1989.

KOCHMANN, J. et al. Genetic evidence for the uncoupling of local aquaculture activities and a population of an invasive species—A case study of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Heredity**, v. 103, n. 5, p.661-671, 2012.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, n. 11, p. 1403-1405, 2008.

JOMBART, T. et al. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2010.

LANGDON, C. et al. Yields of cultured Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg improved after one generation of selection. **Aquaculture**, v. 220, n. 1-4, p. 227-244, 2003.

LAPÈGUE, S. et al. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **The Biological Bulletin**, v. 202, n. 3, p. 232-242, 2002.

LAZOSKI, C. et al. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v. 426, p. 197-212, 2011.

LEBERG, P. L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. **Molecular ecology**, v. 11, n. 11, p. 2445-2449, 2002.

LEGAT, J. F. A. et al. Growth and survival of bottom oyster *Crassostrea gasar* cultured in the Northeast and South of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 2, p. 172-184, 2017.

LIND, C.E. et al. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). **Aquaculture**, v. 286, n. 1-2, p. 12-19, jan. 2009.

LOPES, T.S. et al. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p.728-735, 2009.

MATEUS, J.C. et al. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. **Animal Genetics**, v.35, p.305-313, 2004.

MELO, M. A. D. et al. Development and characterization of ten microsatellite markers for population studies of the native Brazilian oyster *Crassostrea gasar*. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 583-586, 2012.

MILLER, P. A. et al. Genetic Diversity of Cultured, Naturalized, and Native Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*, Determined from Multiplexed Microsatellite Markers. **Journal of Shellfish Research**, v. 31, n. 3, p. 611-617, ago. 2012.

MONTEIRO, J. R. Caracterização dos recursos genéticos da espécie *Crassostrea gasar* no litoral sul e sudeste do Brasil para sua conservação e uso sustentável. 106 f. (Dissertação não publicada), **Universidade de Mogi das Cruzes**, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil. 2021.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING) and *C. brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. **Estuarine And Marine Bivalve Mollusk Culture**, p. 125-134, 18 jan. 2018.

PALUMBI, S. R. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 25, n. 1, p. 547-572, 1994.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PEREIRA, O. et al. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n. 1, p. 19-28, 2018.

PIE, M. R. et al. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 15, p. 1598-1600, 2006.

PLOUGH, L. V. et al. Genetic inviability is a major driver of type III survivorship in experimental families of a highly fecund marine bivalve. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 4, p. 895-910, fev. 2016.

PRITCHARD, J. et al. Inference of population structure using multilocus genotypic data. **Genetic**, v. 155, p. 945-959, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SHAKLEE, J. B.; BENTZEN, P. Genetic identification of stocks of marine fish and shellfish. **Bulletin of Marine Science**, v. 62, n. 2, p. 589-621, 1998.

SHANKS, A. L. Pelagic larval duration and dispersal distance revisited. **The Biological Bulletin**, v. 216, n. 3, p. 373-385, 2009.

SHANKS, A. L. et al. Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves. **Ecological Applications**, v. 13, n. sp1, p. 159-169, 2003.

SILVA, T. F. et al. Identidade e diversidade genética de espécies de ostras nativas no Estado de Sergipe. 2015.

SILVEIRA, R. C. et al. Larval settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) using different systems to induce metamorphosis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 557-562, 2011.

- VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.
- VARELA, E. S. et al. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **J Molluscan Stud** 73:229-234, 2007.
- VARNEY, R. L.; WILBUR, A. E. Analysis of genetic variation and inbreeding among three lines of hatchery-reared *Crassostrea virginica* broodstock. **Aquaculture**, v. 527, p. 735452, out. 2020.
- WAPLES, R. S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 2, p. 167-184, 2006.
- WAPLES, R. S. et al. A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 4, p. 753-756, 2008.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, p. 1358-1370, 1984.
- XU, L. et al. Genetic diversity and effective population size in successive mass selected generations of black shell strain Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) based on microsatellites and mtDNA data. **Aquaculture**, v. 500, p. 338-346, fev. 2019.
- YU, H.; LI, Q. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assessed by microsatellite markers. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 12, p. 1114-1122, dez. 2007.
- ZHONG, X. et al. Genetic variation and breeding signature in mass selection lines of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assessed by SNP markers. **Plos One**, v. 11, n. 3, p.0150868-1, 2016.

3 ARTIGO 2

Contribuição parental desproporcional de *Crassostrea gigas* através de reprodução em *pool* de gametas

Bianca Maria Soares Scaranto^a, Claudio Manoel Rodrigues De Melo^a, Graziela Cleuza Vieira^a, Carolina Antonieta Lopes^b, Francisco Carlos da Silva^a, João Paulo Ramos Ferreira^a, Carlos Henrique Araujo de Miranda Gomes^a, Josiane Ribolli^b *

^a Laboratório de Moluscos Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88061-600, Brasil.

^b Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

* Endereço de e-mail do autor correspondente: josianeribolli@gmail.com (J. Ribolli)

Resumo

Um dos maiores desafios da indústria aquícola é manter a diversidade genética ao longo de gerações. Uma vez que o sucesso do cultivo geralmente depende da produção de sementes em laboratório, tendo em vista que a produção de estoques reprodutores em sistemas fechados pode resultar na diminuição da diversidade em comparação às populações selvagens. *Crassostrea gigas* é uma espécie não nativa do Brasil, que foi introduzida para o cultivo. Entretanto, a produção de *C. gigas* contém uma problemática no que diz respeito ao cultivo, uma vez que as matrizes de reprodutores de *C. gigas* no Brasil, são originárias de indivíduos importados há mais de duas décadas, que podem estar apresentando redução da variabilidade genética. A utilização de *pool* de gametas provenientes de poucos reprodutores na desova pode reduzir a contribuição genética individual, devido às contribuições gaméticas desproporcionais e pode também gerar deriva genética e perda da diversidade genética na prole. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi estimar a contribuição parental de populações de *C. gigas* cultivadas através de reprodução utilizando *pool* de gametas, e inferir o relacionamento e diversidade genética dos parentais e da prole por meio de marcadores moleculares microssatélites. Para esse estudo foram utilizados 50 reprodutores, sendo 25 machos e 25 fêmeas, e 85 descendentes. Foi utilizado o método de fertilização *strip*, com *pool* de gametas. As análises de parentesco dos reprodutores e da progênie foi realizada com oito marcadores microssatélites específicos para *C. gigas*. A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,256 a 0,848, com média de 0,635. A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,224 a 0,895 com média de 0,533. O conteúdo de informação polimórfica se apresentou altamente informativo para 6 dos 8 loci utilizados ($PIC > 0,5$). As análises moleculares de atribuição de parentesco identificaram 60% dos machos e 76% das fêmeas como possíveis pais de 84,7% das progênies. Para 15,3% dos descendentes não foi possível estimar o parentesco. A contribuição desproporcional pode estar associada à qualidade individual dos gametas, a interação espermatozóide-oócito, a competição espermática, o descarte das larvas com crescimento lento durante o manejo da larvicultura, e a desigual sobrevivência da prole. As análises de parentesco demonstraram que a contribuição

parental é desigual e que a técnica de *pool* de gametas utilizada na reprodução das ostras se mostrou ineficiente, com pouca participação de machos e fêmeas para o sucesso da prole.

Palavras-chave: Aquicultura, moluscos bivalves, ostras, reprodução seletiva

Abstract

The expansion of mollusks cultivation on the Brazilian coast is associated with domestication of native species, the introduction of the exotic species, *Crassostrea gigas*, and the development of programs for reproduction and seed production in laboratories. One of the biggest challenges for the aquaculture industry is to maintain genetic diversity across generations. Since the success of cultivation usually depends on the production of seeds in the laboratory, considering that the production of breeding stocks in closed systems can result in a diversity decrease compared to wild populations. *Crassostrea gigas* is a non-native species that was imported for cultivation. However, the production of *C. gigas* contains a problem with regard to cultivation, since the breeding matrices of *C. gigas* in Brazil originate from individuals imported more than two decades ago, which may be showing a reduction in variability genetics. The use of a pool of gametes from a few breeders in spawning may reduce the individual genetic contribution, due to disproportionate gametic contributions and may also generate genetic drift and loss of genetic diversity in the offspring. Thus, the objective of this study is to estimate the parental contribution of populations of *C. gigas* cultivated through reproduction using gamete pools, and to infer the relationship and genetic diversity of parents and offspring through microsatellite molecular markers. For this study, 50 breeders were used, 25 males and 25 females and 85 offspring. The *strip* fertilization method was used, with a pool of gametes. Parental analysis of sires and progeny was carried out with eight specific microsatellite markers for *C. gigas*. The expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.256 to 0.848, with a mean of 0.635. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.224 to 0.895 with a mean of 0.533. The polymorphic information content was highly informative for 6 of the 8 loci used ($PIC > 0.5$).

Molecular analyzes of parentage identified 60% of males and 76% of females as possible parents of 84.7% of progenies. For 15.3% of the descendants it was not possible to estimate the relationship. The disproportionate contribution may be associated with individual gamete quality, sperm-oocyte interaction, sperm competition, discarding slow-growing larvae during larviculture management, and uneven offspring survival. The parentage analyzes showed that the parental contribution is uneven, and else showed that the gamete pool technique used in oyster reproduction proved to be inefficient, with few participations of males and females for the success of the offspring.

Keywords: Aquiculture, bivalve mollusks, oysters, selective breeding.

3.1 INTRODUÇÃO

A ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas*, tem relevante importância na aquicultura brasileira, sendo a terceira espécie mais cultivada do mundo (FAO, 2022) e a segunda mais cultivada no Brasil. Esta espécie, originária da região do Pacífico (IMAI, 1982), está difundida em diversos países da Ásia, Europa, África e América do Sul (KOCHMANN et al., 2012) devido às suas características de interesse biológico (como alta taxa de crescimento, ampla

tolerância às condições ambientais adversas, alta resistência às doenças) e alto valor econômico (DUNDON et al., 2015; FAO, 2022).

No Brasil, *C. gigas* foi introduzida entre os anos 70 e 80 por instituições de pesquisa e universidades dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina (COSTA, 1983; RAMOS, 1986; POLI, 1993). A primeira produção comercial em Santa Catarina foi iniciada no ano de 1991, com o intuito de propiciar uma alternativa à pesca artesanal (OLIVEIRA NETO, 2005). O sucesso do cultivo de moluscos bivalves no Brasil depende da produção de sementes em laboratório (*hatchery*), neste contexto o estado de Santa Catarina vem constantemente aperfeiçoando devido ao fomento do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM, UFSC) e da Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI), permitindo o fortalecimento da pesquisa, extensão e produção destes animais (BORGHETTI; SILVA, 2007; FERREIRA et al., 2011). Além disso, o estado apresenta características litorâneas favoráveis para o cultivo, com enseadas e baías abrigadas, com condições adequadas de temperatura, qualidade e produtividade das águas (COSTA et al., 1988; FERREIRA et al., 2006). O cultivo de moluscos bivalves é uma atividade importante para o desenvolvimento regional tendo em vista seu alcance social e econômico das comunidades litorâneas (FERREIRA; MAGALHÃES, 2004).

A expansão dos cultivos de moluscos na costa brasileira está ligada à domesticação de espécies nativas, à introdução de espécies exóticas como *C. gigas* e ao desenvolvimento de programas de reprodução e produção de sementes em laboratórios (BORGHETTI; SILVA, 2007; FERREIRA et al., 2011; LEGAT et al., 2017).

Um dos maiores desafios da indústria aquícola é manter a diversidade genética ao longo de gerações (ZHONG et al., 2016). Uma vez que o sucesso do cultivo geralmente depende da produção de sementes em laboratório, tendo em vista que a produção de estoques reprodutores em sistemas fechados pode resultar na diminuição da diversidade em comparação às populações selvagens (GJEDREM; BARANSKI, 2009). Essa restrição pode resultar na mudança da frequência de alélicas devido à deriva genética, gargalos e ao aumento da endogamia causados por um tamanho reduzido da população efetiva (APPLEYARD; WARD, 2006; HILLEN et al., 2017). Historicamente a reprodução de organismos aquáticos em laboratório, em geral, segue técnicas de fecundação através de *pool* de gametas provenientes de diversos reprodutores, onde a presença de diversos materiais genéticos permite uma maior combinação de alelos na prole, o que possivelmente aumentaria sua variabilidade genética (YASUI, 1998; GOES, 2016).

Contudo, a reprodução em *pool* de gametas pode gerar uma contribuição parental desequilibrada gerando uma preocupação para programas de reprodução seletiva que envolvem

espécies de desova em massa (BOUDRY et al., 2002). A participação desigual dos reprodutores para formação da próxima geração pode ser gerada pelo distinto potencial de fertilização entre os indivíduos ou ainda pela metodologia de fertilização aplicada, o que pode favorecer o sucesso de alguns gametas em detrimento de outros (GJEDREM; BARANSKI, 2009). A competição reprodutiva pode gerar desigual contribuição parental, resultando na diminuição do sucesso reprodutivo e redução do tamanho efetivo da população, que pode ser atribuído a fatores como qualidade dos gametas, competição espermática e sobrevivência diferencial entre as famílias (BOUDRY et al., 2002; TARIS et al., 2005).

A utilização de *pool* de gametas provenientes de poucos reprodutores na desova pode reduzir a contribuição genética individual, devido às contribuições gaméticas desproporcionais (RIBOLLI; ZANIBONI-FILHO, 2009) e pode também gerar deriva genética e perda da diversidade genética na prole (HEDGECOCK; SLY, 1990; BOUDRY et al., 2002). A drástica redução da diversidade genética pode tornar as populações de cultivo, vulneráveis às doenças e fatores ambientais aos quais não foram adaptadas ao longo das gerações (MATEUS et al., 2004; GJEDREM; BARANSKI, 2009). Estudos sobre diversidade genética explicam relações genéticas, quantificam níveis de variabilidade existentes e sua distribuição entre indivíduos, linhagens e populações (PONTES, 2016).

O cultivo de *C. gigas*, no entanto, contém uma problemática mais acentuada no que diz respeito ao cultivo, uma vez que as matrizes de reprodutores no Brasil, originárias de indivíduos importados há mais de duas décadas, podendo apresentar redução da variabilidade genética. Em 30 de outubro de 1998, entretanto, foi proibida a introdução de ostras juvenis e adultas no Brasil por questões sanitárias (Portaria do IBAMA nº 145- de 29 de outubro de 1998). Contudo, a não entrada de novas matrizes reprodutoras impediu a entrada de novas doenças e patógenos que tem causado mortalidades em massa no cultivo de bivalves em fazendas na Europa e nos Estados Unidos da América (RENAULT, 1996; SABRY et al., 2010; DIVILOV et al., 2021; MADISON et al., 2022; DIVILOV et al., 2023).

Dessa forma, o objetivo deste estudo é estimar a contribuição parental de populações de *C. gigas* cultivadas através de reprodução utilizando *pool* de gametas, e inferir o parentesco e diversidade genética dos parentais e da prole por meio de marcadores moleculares microssatélites.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Origem dos animais experimentais e reprodução

Foram utilizados 50 reprodutores, sendo 25 machos e 25 fêmeas, provenientes do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UFSC), utilizando o método *strip* de desova (FAO, 2015).

Os gametas foram obtidos após o sacrifício dos animais por meio de raspagem do tecido gonádico *strip*. Para determinação do sexo e qualidade dos gametas, foram realizadas coletas do tecido gonádico, que foram analisados em microscópio ótico (40x e 100x). Para os gametas femininos foram verificados o número, forma e tamanho dos oócitos e para os gametas masculinos, avaliou-se o número e motilidade de espermatozóides.

Após o *strip*, os oócitos de cada fêmea foram hidratados separadamente por 1h em recipientes de 5L contendo água marinha filtrada e esterilizada por luz ultravioleta, com salinidade de 35g/kg e temperatura de 25°C. A quantificação dos oócitos hidratados, foi realizada em câmara de *Sedgewick-Rafter* e visualizadas em microscópio ótico com amplificação 40x (FAO, 2015).

A fertilização em *pool* contendo o material genético das 25 fêmeas e 25 machos foi realizada em baldes de 20 L, contendo 10 L de água marinha esterilizada. Para a fecundação dos oócitos foram adicionados de 20 a 30 mL de gametas masculinos a cada 20 minutos, por um período de 1h. Após 24h verificou-se a quantificação e a qualificação morfológica de larvas-D por meio de câmara de *Sedgewic-Rafter* (FAO, 2015).

3.2.2 Larvicultura e assentamento

As larvas-D foram cultivadas em sistema estático com aeração constante em tanque de 20.000 litros, com alimentação a cada 24h, com uma dieta composta de microalgas flageladas *Isochrysis galbana* e/ou *Pavlova lutherii* e diatomácea *Chaetoceros müelleri* (Tabela 1), seguindo metodologia descrita por Helm et al. (2004). O manejo e limpeza do tanque de cultivo ocorreu a cada 24h através de peneiramento, eliminação das larvas mortas renovação total da água marinha e higienização do tanque. A cada 96h as larvas foram coletadas amostras para serem analisadas em microscópio ótico para verificação de motilidade, anatomia e presença de alimento no trato digestório. A larvicultura foi encerrada após 37 dias, quando as larvas apresentavam características para assentamento, como manchas oculares, presença de pé, além de tendência a fixação em substrato.

Tabela 1. Concentrações de microalgas, dietas de microalgas, tamanho de malha da peneira (μm) para triagem de larvas durante a larvicultura.

Dias após a fertilização	Concentração final de microalgas (10^4 cel. mL^{-1})	Proporção de microalgas <i>Isochrysis galbana</i> : <i>Chaetoceros mülleri</i> : <i>Pavlova lutherii</i>	Tamanho da malha da peneira para triagem de larvas (μm)
1	1,5	50:0:50	20
2	3	100:00:00	20
3	3	67:00:33	55
4	3	50:00:50	65
5	3,5	50:00:50	65
6	3,5	100:00:00	65
7	3,5	35:30:25	65
8	5	25:50:25	70
9	5	25:50:25	65/70
10	5	25:50:25	65/70
11	5	49:26:25	65/70
12	5	15:70:15	65/70
13	5	15:70:15	65/70
14	5	15:70:15	65/80
15	5	15:70:15	60/80
16	6	15:70:15	60/90
17	6	17:67:17	60/90
18	6	17:67:17	60/90
19	6	17:67:17	60/90
20	7	14:71:14	60/90
21	7	15:70:15	60/90
22	6,1	16:44:39	65/145
23	7	15:70:15	65/145
24	8	30:63:8	80/180
25	6,6	23:44:33	80/180
26	8	13:70:18	80/180
27	8	15:60:25	80/230
28	8	35:60:5	80/230
29	7,9	19:59:22	80/230
30	8	13:70:28	80/240
31	8	30:53:18	80/240
32	8	30:58:13	80/240
33	5,67	47:44:9	120/240
34	5,67	47:44:9	120/240
35	5,67	47:44:9	120/240
36	5,67	47:44:9	120/240
37	5,67	47:44:9	120/240

Fonte: Elaborado pelo autor.

As sementes recém assentadas foram mantidas em sistema *upwelling*, com manejo diário (renovação total de água marinha e higienização dos tanques) e alimentação com microalgas das espécies *I. galbana* e *C. muelleri*, disponibilizadas duas vezes ao dia. Após 40 dias as sementes foram transferidas para mar, dentro de caixas com fluxo continua de água para proporcionar acesso a alimento.

3.2.3 Coleta de material

Os reprodutores masculinos (n=25) e femininos (n=25) foram sacrificados através da secção das valvas para a obtenção de amostras de tecido do músculo adutor. Amostrou-se aleatoriamente 175 progênies (sementes) com aproximadamente 20 dias de crescimento no mar em caixas de cultivo na Fazenda Marinha da Universidade Federal de Santa Catarina (Figura 1). As amostras foram acondicionadas em microtubos de 2mL contendo etanol 99% e armazenadas em freezer -20°C.

Figura 1: Coleta de amostra de tecido dos reprodutores (A) e das sementes de *C. gigas* (B).



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.4 Extração do DNA e amplificação

A extração do DNA de 50 reprodutores e de 85 sementes foi realizada seguindo o protocolo de tampão salino (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). A quantificação do DNA total foi realizada por NanoDrop.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR), em Termociclador Veriti (Applied Biosystem), utilizando 12 pares de primers microssatélites polimórficos espécie específicos (uscCgi-210, ucdCg-120, ucdCg-198, ucdCg-117, Crgi3, ucdCg-146, Crgi4, otgfa0_0007_B07, Crgi45, Crgi39, ucdCg-152 e otgfa0_0129_E11) (LIU et al., 2017). As amplificações foram conduzidas com primers M13 marcados com fluorescência em sua cauda (SCHUELKE, 2000). As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 10µL, contendo 50ng de DNA, 1x PCR *buffer*, 1,5mM de cloreto de magnésio 1,2mM de dNTP, 8pM de M13 forward (fluorescência VIC, FAM, PET ou NED), 8pM do primer *reverse*, 8pM do primer *forward*, e 1U Taq DNA polimerase. O programa de amplificação constituiu em um passo inicial de desnaturação a 94°C

durante 3 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos à temperatura de anelamento (gradiente de 50°C a 58°C), 75 segundos à 72°C; 8 ciclos de 30 segundos à 94°C, 45 segundos à 53°C, 45 segundos à 72°C, e uma extensão final à 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram genotipados individualmente em sequenciador automático Applied Biosystems 3500xL.

3.2.5 Análises estatísticas

A diversidade genética foi estimada pelo número de alelos (A), número efetivo de alelos (Ae), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) usando GenAlex v. 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A riqueza alélica (Ra) (LEBERG, 2002) e o índice de fixação (Fis) (WEIR; COCKERHAM, 1984), com o valor p para déficit de heterozigoto (pL) e excesso (pS), foram calculados para cada *locus* usando FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi determinado pelo programa Cervus v.3.0 (KALINOWSKI et al., 2007).

Para a determinação do parentesco foram utilizados dois estimadores, COLONY v. 2.0 (JONES; WANG, 2010) e do pacote R 'related' (PEW et al., 2015). O software COLONY utiliza o método de máxima verossimilhança (WANG, 2004; WANG et al., 2009) para atribuir paternidade, parentesco ou inferir categorias de relacionamento entre indivíduos, com base nos seus genótipos multilocus. As análises de parentesco também permitem inferir sobre o tamanho efetivo populacional (N_e) (WANG, 2009), que é definido como o tamanho de uma população ideal, tendo a mesma taxa de variação genética aleatória ao longo do tempo.

A atribuição de parentesco inferida foi realizada através do pacote R 'related' foi conduzida no programa Rstudio v.1.4.1106 (R CORE TEAM, 2021). Inicialmente são testados diferentes estimadores de parentesco: Queller e Goodnight (1989), Li e colaboradores (1993), Ritland (1996), Lynch e Ritland (1999), Wang (2002), Milligan (2003) e Wang (2007). Dentre eles, o estimador de Lynch e Ritland (1999) apresentou um comportamento médio em nosso conjunto de dados e por isso, foi selecionado este estimador para a estimativa de relacionamento r , entre as amostras. Segundo Lynch e Ritland (1999), os relacionamentos podem ser categorizados da seguinte maneira: valores de r menores que 0,25 correspondem a amostras não relacionadas (UR), entre 0,25 e 0,5 a meio-irmãos (HS) e acima de 0,5 a irmãos completos (FS) ou pais e prole (PO). Esses valores foram utilizados para representações de mapas de calor produzidos com o pacote ggplot2 no programa Rstudio R v.1.4.1106 (R CORE TEAM, 2021), para as comparações par-a-par entre as larvas, entre larvas e parentais, e entre os parentais.

3.2 RESULTADOS

Dos doze primers testados, oito amplificaram e foram utilizados nas análises: uscCgi-210, ucdCg-198, ucdCg-117, Crgi3, Crgi4, otgfa0_0007_B07, ucdCg-146 e Crgi39 (LIU et al., 2017).

Foram analisadas 135 amostras sendo 50 reprodutores, sendo 25 machos e 25 fêmeas, além de 85 descendentes destes reprodutores. O número de alelos (A) variou por *locus* de três a 13 (Crgi4 e ucdCg-146, respectivamente), com média de oito. A heterozigosidade esperada (He) variou de 0,256 a 0,848, com média de 0,635. A heterozigosidade observada (Ho) variou de 0,224 a 0,895 com média de 0,533. A população analisada apresentou valores significativos para índice de fixação (Fis), e o conteúdo de informação polimórfica se apresentou altamente informativo para 6 dos 8 loci utilizados (PIC > 0,5) (Tabela 2).

Tabela 2: Diversidade genética dos oito loci para população (reprodutores e prole) de *C. gigas*. Número de alelos (A), número de alelos efetivos (Ae), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), riqueza alélica (Ra), índice de fixação (Fis) e conteúdo de informação polimórfica (Pic). Os asteriscos denotam valores significativos ($p < 0,05$).

Loci	População estudada (reprodutores e prole)						
	A	Ae	Ho	He	Ra	Fis	Pic
ucdCg-117	12	4,40	0,639	0,773	12	0,178*	0,750
ucdCg-198	10	4,06	0,520	0,754	10	0,314*	0,731
Crgi4	3	1,34	0,224	0,256	3	0,129	0,227
otgfa0_0007_B07	6	2,77	0,636	0,639	6	0,009	0,589
ucdCg-146	13	6,58	0,895	0,848	13	-0,051	0,831
Crgi3	5	1,44	0,252	0,304	5	0,174	0,279
uscCgi-210	8	3,51	0,626	0,715	8	0,128	0,682
Crgi39	5	4,80	0,473	0,792	5	0,405*	0,758
Média	8	3,61	0,533	0,635	8	0,164*	0,606

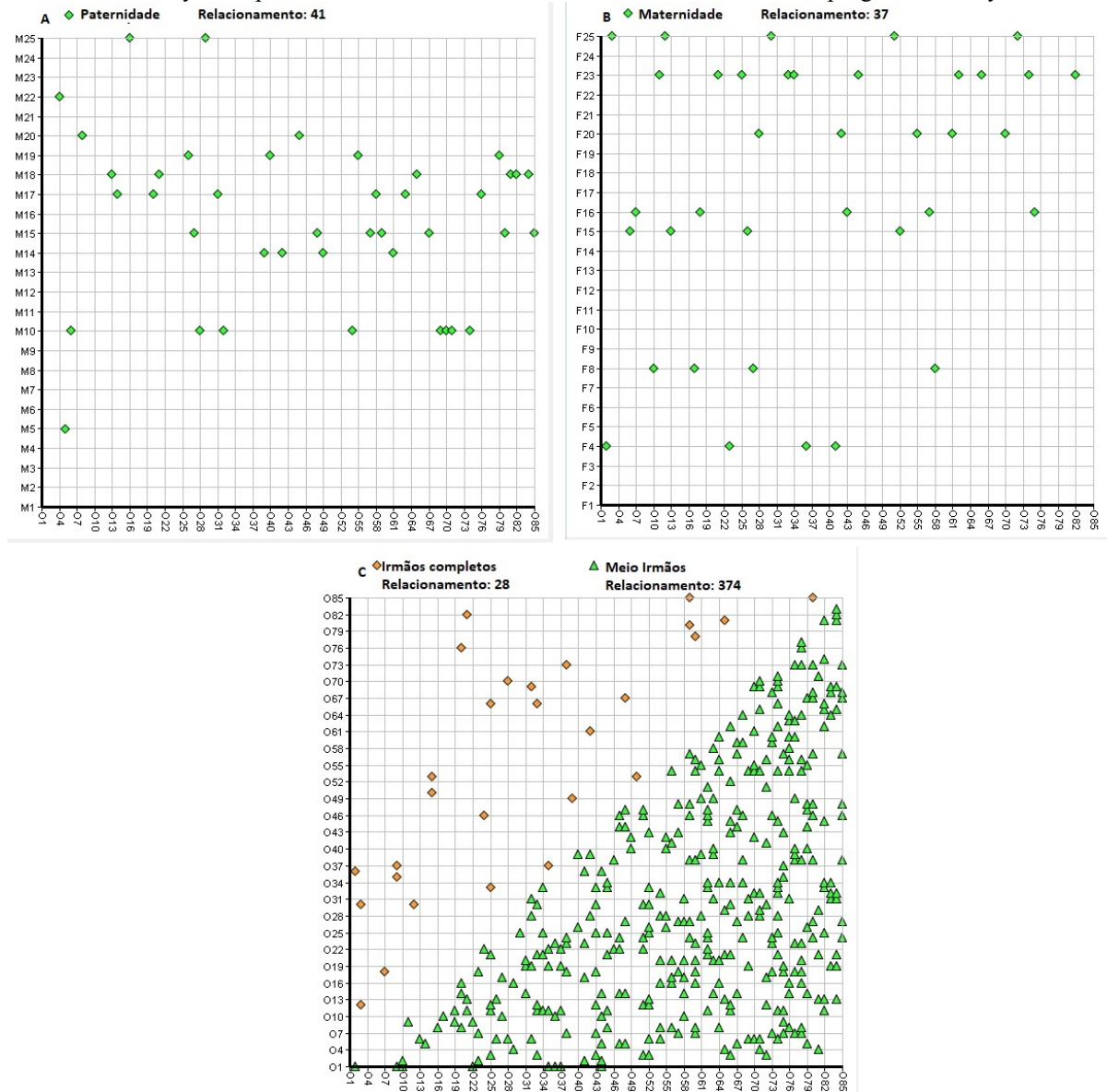
Fonte: Elaborado pelo autor.

A relação de parentesco do COLONY 2.0 é inferida, considerando elevados, valores do índice de relacionamento entre os parentais (possíveis pais e possíveis mães), na análise de dados o programa entra com a informação de pai de mãe e de prole, então nós consideramos, os pais que o programa COLONY 2.0 conseguir inferir.

Das 85 amostras dos descendentes o programa COLONY 2.0 aferiu relação de parentesco de 41 paternidades, 37 maternidades e 28 relações de irmãos completos (Figura 2). As amostras coletadas da prole (n=85) foram atribuídas para 10 (40%) dos 25 machos usados no *pool* e destes, o macho M10 apresentou o maior número de progênes, com oito. Os machos com menor contribuição foi o M5 e M22, com um único descendente amostrado. Das 25 fêmeas usadas no *pool*, sete (28%), foram atribuídas para a prole (n=85) das amostras coletadas. A

fêmea F23 contribuiu com dez sementes e as F4, F8 e F15 contribuiu com quatro indivíduos. As estimativas de N_e da prole foram de 33 indivíduos (95% CI: 22-54).

Figura 2 A: Atribuição de paternidade. B: Atribuição maternidade. C: Atribuição de parentesco de irmãos completos e meio irmãos, pelo método de máxima verossimilhança (WANG, 2004; WANG et al., 2008). Os eixos y e x representam intervalos de ID de amostra. Gráfico obtido no programa Colony.



O estimador Lynch e Ritland (1999) utiliza o método de regressão, que usa o princípio da similaridade. Os pesos utilizados pelo estimador diferem de acordo com o genótipo de referência para um mesmo loco, influenciando a variância das estimativas de coancestria, e que não leva em conta a endogamia.

A classificação dos indivíduos em grupos altamente relacionados ($r \geq 0,5$), revelou que aproximadamente 2,7% de indivíduos aparentados tanto no grupo dos parentais como da prole,

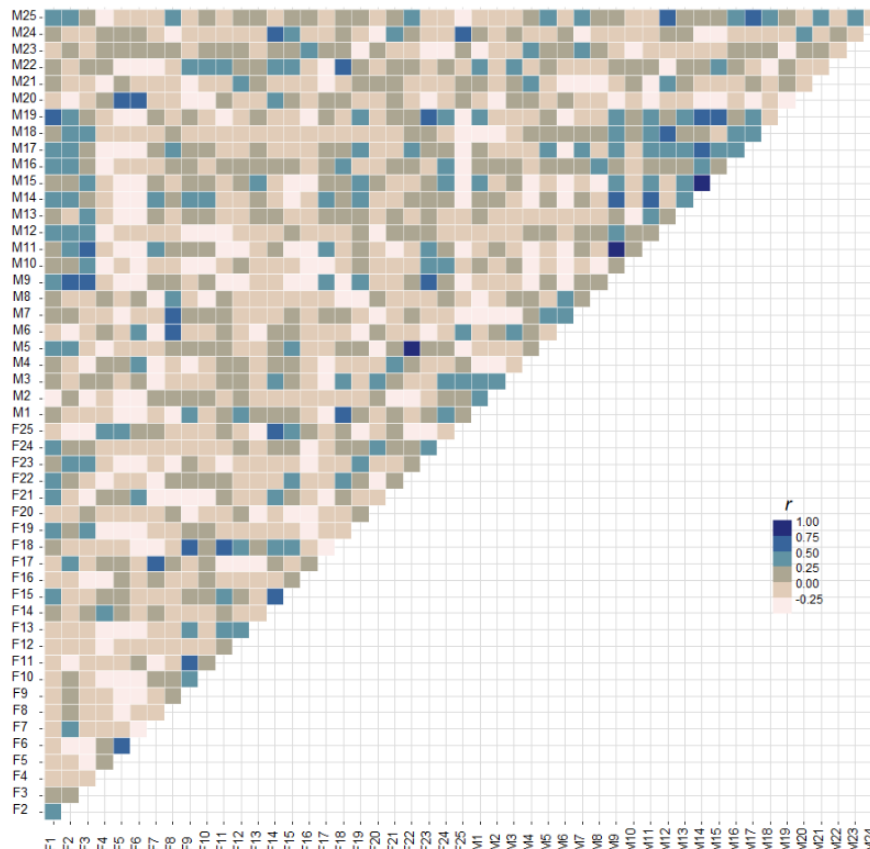
e, aproximadamente, 85% de indivíduos não relacionadas no mapa de calor da distribuição dos valores de parentesco (Figuras 3 e 4).

Os resultados de relacionamento entre os reprodutores as comparações par-a-par indicaram que 86% dos indivíduos não foram relacionados ($r < 0,25$), 11,4% meio irmãos (r entre 0,25 e 0,5), e 2,6% dos indivíduos apresentaram alto índice de relacionamento (irmãos completos ou pais e prole; $r \geq 0,5$).

Os resultados de relacionamento entre a prole as comparações par-a-par indicaram que 84,9% dos indivíduos não são relacionados ($r < 0,25$), 12,3% são meio irmãos (r entre 0,25 e 0,5) e 2,8% dos indivíduos possui alto índice de relacionamento (irmãos completos ou pais e prole; $r > 0,5$), para 15,3% progênie não foi possível atribuir parentesco.

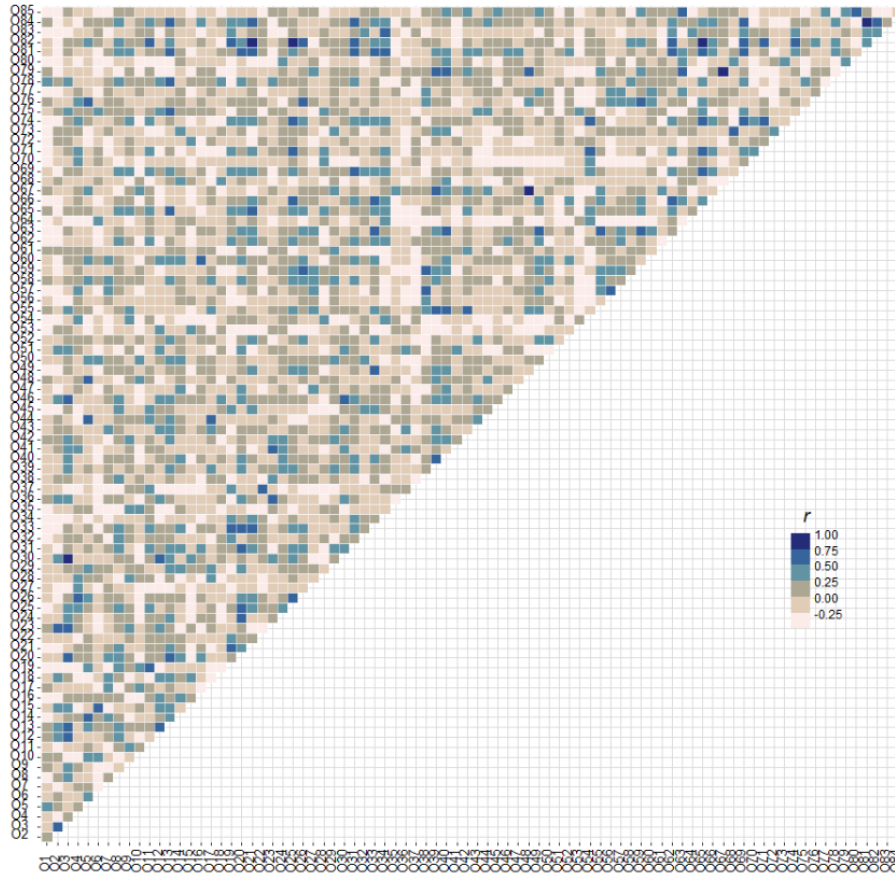
Podemos verificar na Figura 3 que alguns reprodutores apresentaram elevado grau de relacionamos ($r > 0,50$): M22xF18, M24xF14, M24xF25, F25xM17, M25xM12, F14xF25, M1xF18, F22xM5, M9xM11, M14xM15, M14xM11, M14xM9, M9xF23, F11xF18, F18xF9, F17xF7, F9xF11, F3xM9, F3xM11, M9xF2, M19xF1, M20xF5, M20xF6, M19xM14, M19xF23 e M19xM15.

Figura 3: Estimativa de parentesco par-a-par para amostras de reprodutores de *Crassostrea gigas*, correspondem ao mapa de calor do estimador de parentesco de Lynch e Ritland (1999) do pacote R 'related'. Os eixos y e x representam a identificação das amostras. M= machos e F = Fêmeas. Azul escuro indivíduos altamente relacionados, bege indivíduos não relacionados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3: Estimativa de parentesco par-a-par para amostras da prole *Crassostrea gigas* correspondem ao mapa de calor do estimador de parentesco de Lynch e Ritland (1999) do pacote R 'related'. Os eixos y e x representam a identificação das amostras. O= prole azul escuro indivíduos altamente relacionados, bege indivíduos não relacionados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados da Tabela 3.1 e 3.2 apresentam os resultados combinados do COLONY 2.0 e do estimar Lynch e Ritland (Pacote R 'related') sobre a atribuição da paternidade. Como o programa COLONY 2.0 considera os pais, mães e progênie na análise de parentesco, este estimador foi priorizado na atribuição de paternidade/maternidade. Para a progênie onde o programa COLONY 2.0 não atribuiu paternidade e/ou maternidade, utilizamos os valores de r do estimador Lynch e Ritland. São apresentados os valores de r entre candidatos a pais e mães para valores acima de 0,5, com destaque em negrito (Tabelas 3.1 e 3.2), para valores de relacionamento $r > 0,9$.

A atribuição de parentesco combinada entre os dois estimadores permitiu identificar 15 machos (60%) e 19 fêmeas (72%) como possíveis pais de 72 progênies (84,7%). Para 13 (15,3%) descendentes não foi possível estimar o parentesco. A fêmea F23 e os machos M10 e M15 foram os parenteais que deixaram o maior número de filhos na amostra analisada.

Tabela 3.1: Atribuição de maternidade dos estimadores COLONY e Lynch e Ritland (Pacote R 'related'). Para Lynch e Ritland (1999) são apresentados valores superiores de relacionamento $r > 0,5$, e valores de $r > 0,9$ são destacados em negrito. O = Prole, F= Fêmea.

Prole	COLONY	Lynch e Ritland (1999)	Atribuição final
O1	F4	F2	F4
O2	F25	F4 F5 F7 F25	F25
O3		F1 F2 F4 F5 F7 F14 F15 F17	F1
O4		F1 F11 F15 F18 F19 F21 F24	F24
O5		F1 F2 F15 F18 F19 F22	F22
O6	F15	F12	F15
O7	F16	F6 F8 F17	F16
O8		F2 F14 F23	
O9			
O10	F8	F8	F8
O11	F23	F1 F2 F3 F23	F23
O12	F25	F4 F5 F14 F15 F16 F25	F25
O13	F15	F1 F2 F3 F7 F8 F14 F15 F16 F17	F15
O14		F9 F16 F18 F22	F18/F22
O15		F7 F14 F15 F25	F25
O16	F8	F1 F15	F8
O17	F16	F8 F20	F16
O18		F2 F5 F6 F7 F16 F17	F5/F7/F17
O19		F2 F23	F23
O20		F1 F2 F21 F22 F24	F1
O21	F23	F2 F4 F23 F24	F23
O22			
O23	F4	F4 F5 F14 F17 F25	F4
O24		F1 F3 F14 F21	F1
O25	F23	F1 F2 F3 F23 F24	F23
O26	F15	F1 F2 F15 F19 F22 F23 F24	F15
O27	F8	F8 F19	F8
O28	F20	F3 F20	F20
O29		F1 F3 F8 F10 F22	
O30	F25	F2 F4 F14 F15 F25	F25
O31		F1 F2 F3 F22 F23	F1/F2
O32		F15 F18 F23	
O33	F23	F1 F2 F23 F24	F23
O34	F23	F3 F23	F23
O35			
O36	F4	F4 F4 F6	F4
O37			
O38		F7 F17	F17
O39		F1 F2 F3 F24	F16
O40		F1 F2	
O41	F4	F4 F14 F21 F25	F4
O42	F20	F1 F4	F20
O43	F16		F16

O44		F22	
O45	F23	F14 F15 F23	F23
O46		F1 F2 F7 F14 F17	
O47		F9 F11 F13 F18	
O48		F1 F19 F22	
O49		F1 F24	
O50		F1 F8 F11 F15 F18 F22	F8/F11
O51	F25	F4 F25	F25
O52	F15	F15	F15
O53		F5 F25	F25
O54		F23 F24	
O55	F20	F1 F2 F19 F20 F24	F20
O56		F9 F10 F17	F10
O57	F16	F9 F10 F17	F16
O58	F8	F1 F2 F8 F22	F8
O59		F19 F17 F19 F23	F19
O60		F1 F15 F18 F22	
O61	F20	F20	F20
O62		F2 F3 F23	F23
O63	F23	F1 F2 F19	F23
O64		F12	
O65		F2 F3 F23 F24	F3/F23
O66	F23	F2 F3 F19 F23 F24	F23
O67		F1 F19	F19
O68		F7	
O69		F2 F3 F23 F24	F23
O70	F20	F20 F24	F20
O71		F3 F23 F24	
O72	F25	F14 F25	F25
O73		F7	
O74	F23	F1 F2 F3 F23 F24	F23
O75	F16	F3	F16
O76		F2 F19 F22 F24	
O77			
O78		F2 F7 F8 F17	F2
O79		F19	
O80		F13	
O81		F2 F3 F22 F23	F3
O82	F23	F1 F2 F3 F22 F23 F24	F23
O83		F3 F23	
O84		F2 F3 F23	
O85			

Fonte: Elaborado pelo autor.

O47		M11 M14 M15 M18	
O48	M15	M5 M14 M15	M15
O49	M14	M13 M14 M15 M16 M17 M19	M14
O50		M5 M6 M7 M16 M17 M25	
O51		M1	
O52		M12 M16 M17 M18 M25	
O53		M4 M20 M23 M24	
O54	M10	M1 M10	M10
O55	M19	M20 M9 M11 M14 M15 M17 M19	M19
O56		M14	
O57	M15	M14 M15 M17 M19	M15
O58	M17	M5 M7 M8 M9 M11 M14 M16 M17 M25	M17
O59	M15	M9 M11 M13 M14 M15 M17 M19	M15
O60		M4 M5 M12 M16 M17 M21 M25	M25
O61	M14	M14 M15 M23	M14
O62		M9 M11 M14 M15 M19	M9/M11
O63	M17	M1 M11 M12 M13 M14 M15 M16 M17 M19	M17
O64		M10	
O65	M18	M9 M10 M11 M12 M17 M18	M18
O66		M9 M11 M14 M15 M19	
O67	M15	M9 M13 M14 M15 M19	M15
O68		M12	
O69	M10	M9 M10 M11 M18	M10
O70	M10	M10	M10
O71	M10	M1 M9 M10 M11 M19	M10
O72		M1 M2 M3 M6 M24	M3
O73		M1 M13 M14 M15	
O74	M10	M1 M9 M10 M11 M19	M10
O75		M18 M23 M25	
O76	M17	M5 M17 M19	M17
O77		M13	
O78		M9 M11 M17 M18 M23 M25	
O79	M19	M13 M14 M15 M19	M19
O80	M15	M13 M19	M15
O81	M18	M9 M11 M12 M13 M14 M16 M17 M18	M18
O82	M18	M9 M10 M11 M12 M17 M18 M19	M18
O83		M9 M10 M11	
O84	M18	M9 M11 M12 M17 M18 M25	M18
O85	M15	M13 M15 M19	M15

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados de parentesco do estimador Lynch e Ritland foi possível identificar que alguns indivíduos da prole receberam a atribuição de mais de um pai/mãe. Na Tabela 4 estão apresentados esses indivíduos, em que é possível observar, por exemplo, a prole O65, que apresenta as fêmeas F3 e F23 como possíveis mães, e possuem $r=0,5$. A prole O62 teve como possíveis pais M9 e M11, com $r=1$.

Tabela 4: Atribuição de parentesco estimador de Lynch e Ritland (Pacote R 'related'), de reprodutores altamente relacionados.

Prole	Reprodutores	Grau de relacionamento
O65	F3/F23	0,5
O62	M9/M11	1
O50	F8/F11	0,25
O31	F1/F2	0,5
O25	M9/M19	0,8
O21	M12/M18	0,9
O18	F5/F7	0,9
O18	F5/F17	0,4
O18	F7/F17	0,9
O14	F18/F22	0,5
O10	M12/M18	0,9

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 DISCUSSÃO

As análises de parentesco com o conjunto de dados analisados demonstraram contribuição parental desigual, e que a técnica de *pool* de gametas utilizada na reprodução das ostras favorece alguns reprodutores em detrimento de outros. As análises moleculares de atribuição de parentesco combinadas nos permitiram inferir que 60% machos e 76% fêmeas como potenciais parentais das 85 progênes analisadas. Verificamos também um alto nível de relacionamento entre os reprodutores, esta ocorrência se deve ao fato dos grupos utilizados na reprodução fazerem parte de um sistema de cultivo fechado, que faz o cruzamento de grupos para manutenção do mesmo, mas com o tempo, apesar dos cuidados esforços para não que ocorresse cruzamento de grupos aparentadas isto acabou ocorrendo.

Vários fatores podem ter colaborado para que contribuição desproporcional tenha ocorrido, dentre eles, a qualidade dos gametas individual, a interação espermatozóide-oócito, a competição espermática, o descarte das larvas com crescimento lento durante o manejo da larvicultura, e possível desigual sobrevivência da prole (BOUDRY et al., 2002; LI et al., 2009).

Dentre os fatores que podem contribuir com a desproporcional contribuição parental é a qualidade dos gametas, que pode variar entre os reprodutores quando os cruzamentos são realizados (BOUDRY et al., 2002; LI et al., 2009). Apesar da escolha cuidadosa de reprodutores maduros e viáveis, a contribuição parental pode mudar ao longo do processo de desenvolvimento dos descendentes devido à alta mortalidade durante a metamorfose (LI et al., 2009). Ou seja, a seleção pode ter ocorrido nos estágios iniciais, favorecendo indivíduos da prole, descendentes de alguns parentais em detrimento de outros (BOUDRY et al., 2002). A interação espermatozóide-oócito e a competição espermática também devem ser consideradas

como prováveis explicações para as diferentes contribuições dos gametas parentais na prole. Inclusive diversos estudos tanto para ostras (GAFFNEY et al., 1993; BOUDRY et al., 2002; TARIS et al., 2005) quanto para peixes demonstram esse cenário (ALLENDORF; RYMAN 1987; RIBOLLI; ZANIBONI-FILHO, 2009; BEIRÃO et al., 2019). Contudo, a interação espermatozóide-ócito não foi avaliada no presente estudo.

A contribuição parental seletiva e não intencional é uma preocupação recorrente para programas de reprodução seletiva que envolvem espécies de desova em massa (BOUDRY et al., 2002). Em sistemas de produção, a fecundação em *pool* de gametas ainda é comumente utilizada durante a reprodução de organismos aquáticos, devido à facilidade de manejo dos gametas (BEIRÃO et al., 2019), apesar de pretéritos já terem indicado que *pool* de gametas não são adequados em sistemas de fertilização de organismos aquáticos, como peixes (RIBOLLI; ZANIBONI, 2009; SOURINEJAD et al., 2011). A metodologia de produção assume inequivocamente que todos os participantes irão deixar descendentes nas mesmas proporções. Isso porque a contribuição de diversos parentais permite uma maior combinação de alelos na prole, mantendo elevados índices de variabilidade genética (YASUI, 1998; LI et al., 2009; GOES, 2016).

O uso sucessivo de *pool* de gametas nos processos de produção pode levar a redução da diversidade genética. Quando comparados aos dados obtidos de diversidade genética de populações selvagens, os valores de heterozigosidade esperada para *C. gigas* selvagens variaram de H_e 0,773 a 0,958 (AN et al., 2013; YU; LI, 2007; MILER et al., 2012; MEISTERTZHEIM et al., 2013), enquanto que a população de cultivo apresentou valor de H_e média 0,637, menor do que os dados encontrados na literatura para populações de cultivo (AN et al., 2013; YU; LI, 2007; ZHANG et al., 2017; LI et al., 2006).

O tamanho populacional efetivo da população, apresentou valor baixo, de modo geral, estando intimamente relacionado como o sistema de acasalamento dos indivíduos, restrições do sistema de cultivo, proporção sexual tendenciosa, contribuição desigual de gametas, viabilidade diferente de gametas, e pela seleção de indivíduos com características de interesse (LI et al., 2007; XU et al., 2019). A competição reprodutiva pode afetar negativamente o sucesso reprodutivo, levando a uma forte redução na diversidade genética e no tamanho efetivo da população (BOUDRY et al., 2002; TARIS et al., 2005).

A menor diversidade genética da população de cultivo ($H_e = 0,635$) deve ser dar ao fato de o cultivo ser formado de uma população fechada e sem introdução de novos indivíduos, uma vez que a introdução de ostras juvenis e adultas, no Brasil é proibida por questões sanitárias desde 1998 (Portaria do IBAMA nº 145-n, de 29 de outubro de 1998). Desta forma foram

formados grupos através de seleção em massa, os reprodutores utilizados no presente estudo foram selecionados ao longo de gerações, para se adaptarem às características do local de cultivo (por exemplo, temperatura, salinidade, alimento, manejo). A reprodução de animais em sistemas de cultivo ao longo de gerações sem estratégias reprodutivas adequadas leva inevitavelmente a um declínio da variabilidade genética, que pode ser comprometedora para a viabilidade dos sistemas produtivos (VILELA et al., 2020). Isso se dá porque a variabilidade genética reduzida limita a possibilidade de melhoramento genético futuro para o cruzamento seletivo (BOUDRY et al., 2002). Tanto em populações naturais quanto de cultivo se busca garantir a preservação de níveis mais altos de diversidade genética, proporcionando a manutenção e a exploração do potencial genético das espécies aquáticas (FRANKHAM et al., 2004).

O fato dos estimadores de paternidade utilizados neste estudo não apresentarem a mesma atribuição de parentesco para alguns poucos indivíduos da prole, ocorre pelas condições da sensibilidade de cada um dos estimadores, ausência de genótipos em alguns indivíduos, pais e prole, e também pelo fato dos reprodutores serem aparentados.

Diferentes estimadores de paternidade podem empregar métodos estatísticos distintos para inferir a paternidade com base nos dados genéticos, por exemplo o programa Colony infere o parentesco, a partir dos resultados de possíveis genótipos parentais para cada indivíduo da progênie. Já o estimador Lynch e Ritland implementado no pacote R 'related', não leva em conta a endogamia e não há distinção entre possíveis pais e prole.

De modo geral os estimadores foram congruentes para maioria das inferências, e tiveram sucesso para atribuição de parentesco. O número de marcadores utilizados foram adequados e tiveram alta informação polimórfica, contudo alguns indivíduos não amplificaram para todos os primers com isso tivemos 5,27% de alelos faltantes. Os estimadores utilizados não atribuíram parentesco para 13 indivíduos, correspondendo a 15,3% da prole, os reprodutores e a prole que não tiveram atribuição de relacionamento não significa que esses indivíduos não estão relacionados, apenas que os valores de cortes utilizados nos programas utilizados não conseguiram inferir por ter valores baixos, isto ocorreu muito provavelmente devido a falhas na genotipagem, ou pelo fato dos reprodutores serem aparentados dificultando assim atribuição de parentesco.

Estudos que analisam aspectos genéticos como contribuição parental, diversidade genética em progênies obtidas a partir de diferentes sistemas de acasalamento são importantes para gestão do manejo reprodutivo, uma vez que irão propor formas de diminuir a depressão endogâmica em estoques mantidos em cativeiro. A drástica redução da diversidade genética

pode perder alelos importantes e fixar alelos indesejáveis, tornando as populações vulneráveis às doenças e fatores ambientais aos quais não foram adaptadas ao longo das gerações. Além disso, se faz necessário desenvolver novas propostas de acasalamento com a população de ostras do Pacífico cultivada no Brasil uma vez que a introdução de ostras juvenis e adultas no Brasil foi proibida por questões sanitárias.

3.5 REFERÊNCIAS

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ALLENDORF, F.W.; RYMAN, N. Genetics and fishery management. **Population Genetics and Fishery Management**, p. 1-19, 1987.

AN, H. S. et al. Comparative genetic diversity of wild and hatchery-produced Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) populations in Korea using multiplex PCR assays with nine polymorphic microsatellite markers. **Genes & Genomics**, v. 35, p. 805-815, 2013.

APPLEYARD, S. A. et al. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 148-159 2006.

BEIRÃO, J. et al. Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. **Theriogenology**, v. 133, p. 161-178, 2019.

BORGHETTI, J.R.; DA SILVA, U.A.T. Principais sistemas produtivos empregados comercialmente, in: OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J.R., SOTO, D. (Eds.), **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, p. 97-117, 2007.

BOUDRY, P. et al. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. **Aquaculture**, v. 204, n. 3-4, p.283-296. 2002.

COSTA, P.F. Cultivo de ostras: biologia e tecnologia para o cultivo de ostras. In: Rio de Janeiro: **Instituto de Pesquisa da Marinha**, p.1B-40B. 1983. Manual De Maricultura

COSTA, P.F. Cultivo de ostras: biologia e tecnologia para o cultivo de ostras. In: MANUAL DE MARICULTURA. Rio de Janeiro: **Instituto de Pesquisa da Marinha**, p.1B-40B. 1988.

DIVILOV, K. et al. Genetic improvement of survival in Pacific oysters to the Tomales Bay strain of OsHV-1 over two cycles of selection. **Aquaculture**, v. 543, p. 737020, 2021.

DIVILOV, K. et al. Marker-assisted selection in a Pacific oyster population for an antiviral QTL conferring increased survival to OsHV-1 mortality events in Tomales Bay. **Aquaculture**, v. 567, p. 739291, 2023.

- DUNDON, W. G. et al. Detection of type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. **Aquaculture**, 314: 49–52, 2015.
- FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The state of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: Sofia, p.220. 2022.
- FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Cultured aquatic species information programme. *Crassostrea gigas*. **In FAO Fisheries and Aquaculture**. 2005 - 2015.
- FERREIRA, J. F. et al. Physical-chemical parameters of seawater mollusc culture sites in Santa Catarina-Brazil. **Journal of Coastal Research**, p. 1122-1126, 2006.
- FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. Cultivo de mexilhões. In: POLI, C. R. et al. *Aquicultura: experiências brasileiras*. Florianópolis: Multitarefa Editora, p. 221-250, 2004.
- FERREIRA, J. F. et al. Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, p.192-197, 2011.
- FRANKHAM, R. Relationship of genetic variation to population size in Wildlife. **Conservation Biology**, v. 10, n. 6, p. 1500-1508, 1996.
- FRANKHAM, R. et al. **A primer of conservation genetics**. Cambridge University Press, 2004.
- GAFFNEY, P. M. et al. Gametic incompatibility in wild and cultured populations of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Aquaculture**, v. 115, n. 3-4, p. 273-284, 1993.
- GJEDREM, T; BARANSKI, M. **Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction**. Springer, 221, 2009.
- GOES, M. D. Estratégias de acasalamento com sêmen fresco e criopreservado na reprodução artificial de *Rhynchoplax quelen*: parâmetros reprodutivos e variabilidade genética dos parentais e das proles. 49 f. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Universidade Federal do Paraná, Palotina**, 2016.
- GOUDET, J. FSTAT (version 1.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3) 2002.
- HEDGECOCK, D.; SLY, F. L. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Aquaculture** 88, 21–38, 1990.
- HELM, M. M. et al. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. **In FAO Fisheries and Aquaculture**, 2004.
- HILLEN, J. E. J. et al. Estimates of genetic variability and inbreeding in experimentally selected populations of European sea bass. **Aquaculture**, v. 479, p. 742-749, 2017.

IMAI, T. Aquaculture in Shallow Seas: progress in shallow sea culture. 3 ed. New Delhi: **Pauls Press**, 179p. 1982.

JONES, O. R.; WANG, J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 551-555, 2010.

KALINOWSKI, S. T. et al. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099-1106, 2007.

KOCHMANN, J. et al. Genetic evidence for the uncoupling of local aquaculture activities and a population of an invasive species A case study of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal of Heredity**, v. 103, n. 5, p.661-671, 2012.

LEBERG, P. L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. **Molecular ecology**, v. 11, n. 11, p. 2445-2449, 2002.

LEGAT, J. F. A. et al. Growth and survival of bottom oyster *Crassostrea gasar* cultured in the Northeast and South of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 2, p. 172-184, 2017.

LI, C. C. et al. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. **Human heredity**, v. 43, n. 1, p. 45-52, 1993.

LI, Q. et al. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. **Aquaculture**, v. 259, n. 1-4, p. 95-102, 2006.

LI, R; YU, R. Parentage determination and effective population size estimation in mass spawning Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, based on microsatellite analysis. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 5, p. 667-677, 2009.

LIU, Y. G; LIU, L. X. Isolation and characterization of twenty two polymorphic simple sequence repeat markers from AFLP sequences of *Crassostrea gigas*. **Conservation Genetics Resources**,7: 659–661, 2015.

LIU, T. et al. Development of genomic microsatellite multiplex PCR using dye-labeled universal primer and its validation in pedigree analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Journal of Ocean University of China**, v. 16, p. 151-160, 2017.

LYNCH, M; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics**, v. 152, n. 4, p. 1753-1766, 1999.

MADISON, D. et al. Bacteriophages improve survival and metamorphosis of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to *Vibrio coralliilyticus* strain RE98. **Aquaculture**, v. 555, p. 738242, 2022

MATEUS, J.C. et al. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. **Animal Genetics**, v.35, p.305-313, 2004.

MEISTERTZHEIM, A. L. et al. Genetic structure of wild European populations of the invasive Pacific oyster *Crassostrea gigas* due to aquaculture practices. **Marine Biology**, v. 160, p. 453-463, 2013.

MILLER, P. A. et al. Genetic diversity of cultured, naturalized, and native Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, determined from multiplexed microsatellite markers. **Journal of Shellfish Research**, v. 31, n. 3, p. 611-617, 2012.

MILLIGAN, B. G. Maximum-likelihood estimation of relatedness. **Genetics**, v. 163, n. 3, p. 1153-1167, 2003.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING) and *C. brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. **Estuarine And Marine Bivalve Mollusk Culture**, p. 125-134, 2018.

OLIVEIRA NETO, F. M. Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina. Florianópolis: **Epagri**, 67, 2005.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

POLI, C. R. O cultivo de ostras em Santa Catarina. In: MANUAL DO 1 CURSO SOBRE CULTIVO DE O OSTRAS. Florianópolis: UFSC/ **Departamento de Aquicultura**, p.5-10. 1993.

PONTES, D. S. Seleção De Variáveis No Estudo Da Diversidade Genética Via Análise De Procrustes. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Programa de Pós-graduação em Estatística Aplicada e Biometria, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.**

QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, n. 2, p. 258-275, 1989.

R CORE TEAM et al. R: v.1.4.1106 A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>, 2021.

RAMOS, M. I. S. The comparative growth survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg, *C. gigas* var. Kumamoto) and mangrove oyster (*C. rhizophorae*). In Todos os Santos Bay, Brazil. **Ciências e Cultura**, v.34, n.9, p.1604-1615, 1986.

RENAULT, T. Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. **Revue scientifique et technique**, 15 (2), 551-561, 1996.

RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 629-634, 2009.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetics Research**, v. 67, n. 2, p. 175-185, 1996.

SABRY, R. C. Patógenos em ostras na Ilha de Santa Catarina-SC e no Estuário do Rio Pacoti-CE, com ênfase no protozoário Perkinsus. 2010. 124f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – **Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC**, Florianópolis, 2010.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SOURINEJAD, I. et al. Parentage assignment of progeny in mixed milt fertilization of *Caspian brown trout* *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 26, p. 5084-5090, 2011.

TARIS, N. et al. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture Research** 36, 516–518, 2005.

VILELA, L. C. V. et al. Estratégias para conservação de recursos genéticos de peixes nativos de interesse econômico. **Embrapa Pesca e Aquicultura**, 36, 2020.

WANG, J. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. **Molecular ecology**, v. 18, n. 10, p. 2148-2164, 2009.

WANG, J. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 1203-1215, 2002.

WANG, J. et al. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. **Genetics**, v. 181, n. 4, p. 1579-1594, 2009.

WANG, J. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. **Genetics**, v. 166, n. 4, p. 1963-1979, 2004.

WANG, J. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. **Genetics Research**, v. 89, n. 3, p. 135-153, 2007.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, p. 1358-1370, 1984.

XU, L. et al. Genetic diversity and effective population size in successive mass selected generations of black shell strain Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) based on microsatellites and mtDNA data. **Aquaculture**, v. 500, p. 338-346, 2019.

YASUI, Y. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. **Trends In Ecology & Evolution**, v. 13, n. 6, p. 246-250, 1998.

YU, H.; LI, Q. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* assessed by microsatellite markers. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 12, p. 1114-1122, 2007.

ZHANG, J. et al. The impact of successive mass selection on population genetic structure in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) revealed by microsatellite markers. **Aquaculture International**, v. 26, n. 1, p. 113-125, 2017.

ZHONG, X. et al. Genetic Variation and Breeding Signature in Mass Selection Lines of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Assessed by SNP Markers. **Plos One**, v. 11, n. 3, p.0150868-1, 2016.

4 CONCLUSÃO GERAL

Estudos que analisam aspectos genéticos como contribuição parental, diversidade e estrutura genética de populações selvagens e de cultivo são importantes para gestão do manejo reprodutivo. Uma vez que irão propor formas de diminuir a endogamia em estoques mantidos em cativeiro, visto que a drástica redução da diversidade genética pode tornar as populações vulneráveis às doenças e a fatores ambientais aos quais não foram adaptadas ao longo das gerações.

Os marcadores microssatélites utilizados neste estudo se mostraram eficientes tanto para as análises de diversidade e estrutura genética quando para a aferição de parentesco.

Os resultados do Capítulo 2 revelaram a existência de dois principais grupos genéticos de *C. gasar*, um formado pela população proveniente de cultivo (FAR) e um outro grupo, composto pelas populações selvagens de diferentes pontos do litoral Sul (FLN, PAR, SFS) e Sudeste do Brasil (CAN).

As análises de parentesco analisadas no Capítulo 3 demonstraram que a contribuição parental é desigual e que a técnica de *pool* de gametas utilizada na reprodução das ostras se mostrou ineficiente, com pouca participação de machos e fêmeas para o sucesso da prole. Vários fatores podem ter colaborado para que contribuição desproporcional tenha ocorrido, dentre eles, a qualidade dos gametas, a incompatibilidade gamética, a competição espermática, o descarte das larvas menores durante o manejo e a desigual sobrevivência da prole.

A preservação da diversidade genética em populações naturais e de cultivo garante a conservação e a exploração do potencial genético das espécies aquáticas. Deste modo, o monitoramento da população de cultivo e o estabelecimento de valores de referência de diversidade genética permitirão adotar estratégias, tanto para a viabilidade da população de cultivo, como para tomadas de decisão para o correto manejo das populações de cultivo e selvagens.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- BALDAN, A. P. et al. Sustainable mariculture in Paraná coast, Brazil: updates and perspectives. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, n. 4, p. 491-497, 2009.
- BORGHETTI, J. R.; DA SILVA, U. A. T. Principais sistemas produtivos empregados comercialmente, in: OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J.R., SOTO, D. (Eds.), **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Curitiba, p. 97-117, 2007.
- BOUDRY, P et al. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. **Aquaculture**, v. 204, n. 3-4, p.283-296, 2002.
- BRUNETTO, L. J. Cultivo da ostra *Crassostrea gasar* em diferentes densidades. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura**, Florianópolis, 2018.
- BRUNETTO, L. J. et al. The effect of density on the cultivation of the native mangrove oyster *Crassostrea tulipa* (Lamarck, 1819). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 48, n. 5, p. 855-868, 2020.
- CARPENTER, K. E.; DE ANGELIS N. The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 1: Introduction, mollusks, crustaceans, hagfishes, sharks, batoid fishes and chimaeras. Rome: **FAO**. 2016
- CHEN, N. et al. Effects of artificial selection practices on loss of genetic diversity in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 9, p. 4923-4933, 24, 2017.
- CHRISTO, S. W. et al. Descrição alimentar e estágio de maturação de *Crassostrea brasiliiana* comercializadas no mercado municipal de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 19, n. 2, p. 1-2, 2016.
- COSTA, P. F. Cultivo de ostras: biologia e tecnologia para o cultivo de ostras. In: MANUAL DE MARICULTURA. Rio de Janeiro: **Instituto de Pesquisa da Marinha**, p.1B-40B. 1983.
- DAI, P. et al. Assessment of parental contribution and effective population size from a 3×3 diallel cross of clam *Meretrix meretrix*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 32, n. 2, p.306-315, 2014.
- DUNDON, W. G. et al. Detection of type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. **Aquaculture**, 314: 49–52, 2015.
- EDING, H. Conservation of genetic diversity: assessing genetic variation using marker estimated kinships. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Department of Animal Sciences, Wageningen University, Wageningen. 79, 2002.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The state of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: Sofia, p.220, 2022.

FAO. Cultured aquatic species information programme. *Crassostrea gigas*. **In FAO Fisheries and Aquaculture**. 2005 - 2015.

FERGUSON, A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, v. 47, n, p.103-126, 1995.

FERREIRA, J. F. et al. Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, p.192-197, 2011.

FRANKHAM, R. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. **Conservation Biology**, v. 10, n. 6, p. 1500-1508, 1996.

HELM, M. M. et al. Hatchery culture of bivalves: a practical manual. **In FAO Fisheries and Aquaculture**, 2004.

GALTSOFF, P. S. The American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. **Fishery Bulletin**, v. 64. 480 p, 1964.

GALVÃO, M.S. N. et al. Performance of juvenile culture of the mangrove oyster *Crassostrea sp.* in suspended lanterns in subtidal zone of the Cananéia estuary and Itaguá bay, Ubatuba (São Paulo state, Brazil). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 401-411, 2009.

GJEDREM, T. Selection and breeding programs in aquaculture. Dordrecht: **Springer**, 2005.

GJEDREM, T; BARANSKI, M. Selective Breeding in Aquaculture: An Introduction. **Springer**, 221, 2009.

GOES, M. D. Estratégias de acasalamento com sêmen fresco e criopreservado na reprodução artificial de *Rhynchoplax quelen*: parâmetros reprodutivos e variabilidade genética dos parentais e das proles. 49 f. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Universidade Federal do Paraná**, Palotina, 2016.

GOSLING, E. Bivalve mollusks: biology, ecology and culture. **Oxford: Fishing News Books**, 2003.

HEDGECOCK, D.; SLY, F. L. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Aquaculture** 88, 21–38, 1990.

IBGE. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção Pecuária Municipal (PPM), 2022.

IGNÁCIO, B. L. et al. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**. v. 136, p. 987-991, 2000.

IMAI, T. Aquaculture in Shallow Seas: progress in shallow sea culture. 3 ed. **New Delhi: Pauls Press**, 179p. 1982.

IN, V. et al. Can genetic diversity be maintained across multiple mass selection lines of Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata* despite loss within each? **Aquaculture**, v. 454, p. 210-216, 2016.

KOCHMANN, J. et al. Genetic evidence for the uncoupling of local aquaculture activities and a population of an invasive species—A case study of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Journal Of Heredity**, v. 103, n. 5, p.661-671, 2012.

LAPÈGUE, S. et al. TransAtlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, v. 202 p. 232- 242, 2002.

LAZOSKI, C. et al. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v. 426, p. 197-212, 2011.

LEGAT, J. F. et al. Crescimento e sobrevivência da ostra de fundo, *Crassostrea gasar*, cultivada no Nordeste e Sul do Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 2, p. 172-184, 2017.

LIND, C. E. et al. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). **Aquaculture**, v. 286, n. 1-2, p. 12-19, 2009.

LIU, Y. G.; LIU, L. X. Isolation and characterization of twenty two polymorphic simple sequence repeat markers from AFLP sequences of *Crassostrea gigas*. **Conservation Genetics Resources**, 7: 659–661, 2015.

LOPES, T. S. et al. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p.728-735, 2009.

LU, X. et al. An effective method for parentage determination of the clam (*Meretrix meretrix*) based on SSR and CO1 markers. **Aquaculture**, 318: 223–228, 2011.

MATEUS, J. C. et al. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. **Animal Genetics**, v.35, p.305-313, 2004.

MELO, D. C. et al. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificações de plantéis de tilápias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p.220-224, 2008.

MILLER, P.A. et al. Genetic Diversity of Cultured, Naturalized, and Native Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*, Determined from Multiplexed Microsatellite Markers. **Journal of Shellfish Research**, v. 31, n. 3, p. 611-617, 2012.

MOREIRA, A. A. et al. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p.521-526, 2007.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **O que é aquicultura**. Brasília 2011.

NASCIMENTO, I. A. "Crassostrea rhizophorae (Guilding) and C. brasiliana (Lamarck) in South and Central America." **Estuarine and marine bivalve mollusk culture** 1 125-134. 1991.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING) and *C. brasiliana* (Lamarck) in South and Central America. **Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture**, p. 125-134, 2018.

OLIVEIRA NETO, F. M. Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, p 67, 2005.

OLIVEIRA, S. N. et al. Análise genética de três gerações de tilápia do Nilo (linhagem GIFT) utilizando marcador molecular RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**: 33:207-212, 2011.

PEREIRA, O. M. et al. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 29, no. 1, p. 19-28, 2003.

PLOUGH, L. V. et al. Genetic inviability is a major driver of type III survivorship in experimental families of a highly fecund marine bivalve. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 4, p. 895-910, 2016.

POLI, C. R. Cultivo de ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*). In: Aquicultura. Experiências Brasileiras. Florianópolis: **Multitarefa**, p. 251–266. 2004.

POLI, C. R. O cultivo de ostras em Santa Catarina. In: MANUAL DO 1 CURSO SOBRE CULTIVO DE O OSTRAS. Florianópolis: UFSC/ Departamento de Aquicultura, p.5-10. 1993.

PONTES, D. S. Seleção De Variáveis No Estudo Da Diversidade Genética Via Análise De Procrustes. 2016. 49 f. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Programa de Pós-graduação em Estatística Aplicada e Biometria, Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, 2016.

POVH, J. A. et al. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.27, p.1- 10, 2005.

QUAYLE, D. B.; NEWKIRK, G. F. Farming bivalve molluscs: methods for study and development. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, La., US, 1989.

RAMOS, M. I. S. The comparative growth survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thumberg, *C. gigas* var. Kumamoto) and mangrove oyster (*C. rhizophorae*). In Todos os Santos Bay, Brazil. **Ciências e Cultura**, v.34, n.9, p.1604-1615, 1986.

- RIBEIRO, R. P. et al. Genetic characteristics of *Tambaqui broodstocks* in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 41, p.2375-2386, 2016.
- RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 629-634, 2009.
- RIOS, E. C. et al. Seashells of Brazil 2. ed. Editora da FURG, Rio Grande. 368 p., 113 pls, 1994.
- SABRY, R. C. Patógenos em ostras na Ilha de Santa Catarina-SC e no Estuário do Rio Pacoti-CE, com ênfase no protozoário Perkinsus.2010. 124f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – **Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC**, Florianópolis, 2010.
- SILVEIRA, R. C. et al. Larval settlement and spat recovery rates of the oyster *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) using different systems to induce metamorphosis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 557-562, 2011.
- TARIS, N. et al. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture Research** 36, 516–518, 2005.
- UTTING, S. D.; SPENCER, B. E. **The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles**. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research, 1991.
- VARELA, E. S. et al. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **J Molluscan Studies** 73:229-234, 2007.
- VARNEY, R. L.; WILBUR, A, E. Analysis of genetic variation and inbreeding among three lines of hatchery-reared *Crassostrea virginica* broodstock. **Aquaculture**, v. 527, p. 735452, 2020.
- WANG, L. et al. Genetic Diversity and Differentiation of the Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) Between and Within Cultured Stocks and Wild Populations Inferred from Microsatellite DNA Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 7, p. 4378-4394, 2011.
- XIAO-GU, Z. et al. Applications of microsatellite markers in studies of genetics and breeding of fish. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 83-87, 2006.
- XU, L. et al. Genetic diversity and effective population size in successive mass selected generations of black shell strain Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) based on microsatellites and mtDNA data. **Aquaculture**, v. 500, p. 338-346, 2019.
- YASUI, Y. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. **Trends In Ecology & Evolution**, v. 13, n. 6, p. 246-250, 1998.

YU, H.; LI, Q. Genetic Variation of Wild and Hatchery Populations of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Assessed by Microsatellite Markers. **Journal Of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 12, p. 1114-1122, 2007.

ZHANG, J. et al. The impact of successive mass selection on population genetic structure in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) revealed by microsatellite markers. **Aquaculture International**, v. 26, n. 1, p. 113-125, 2017.

ZHONG, X. et al. Genetic Variation and Breeding Signature in Mass Selection Lines of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Assessed by SNP Markers. **Plos One**, v. 11, n. 3, p.0150868-1, 2016.

ZHOU, Y. et al. Development of microsatellite markers and genetic diversity in wild and cultured populations of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) along the Yangtze River. **Aquaculture International**, v. 28, n. 5, p. 1867-1882, 2020.