



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VANESSA ALVES PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, MORFOLÓGICA E GENÉTICA DO
SEXO EM PEPINO DO MAR *Holothuria grisea* (Selenka, 1987) NO NORDESTE DO
BRASIL**

FORTALEZA-CEARÁ

2017

VANESSA ALVES PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, MORFOLÓGICA E GENÉTICA DO SEXO
EM PEPINO DO MAR *Holothuria grisea* (Selenka, 1987) NO NORDESTE DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

FORTALEZA-CEARÁ
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Pereira, Vanessa Alves.

Caracterização comportamental, morfológica e genética do sexo em pepino do mar *Holothuria grisea* (Selenka, 1987) no nordeste do Brasil [recurso eletrônico] / Vanessa Alves Pereira. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 79 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientação: Prof.^a Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley.

Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

1. Biologia Reprodutiva. 2. Controle Ambiental. 3. Determinação Sexual. 4. Marcadores Moleculares. I. Título.

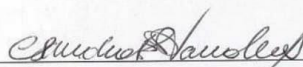
VANESSA ALVES PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, MORFOLÓGICA E GENÉTICA DO
SEXO EM PEPINO DO MAR *Holothuria grisea* (Selenka, 1987) NO NORDESTE DO
BRASIL.

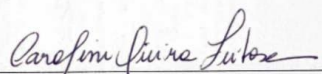
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como
requisito parcial para obtenção ao título
de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 18 / 07 / 2017

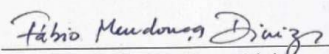
BANCA EXAMINADORA



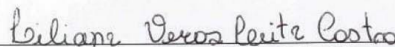
Profª. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Orientadora



Profª. Dra. Caroline Vieira Feitosa
Universidade Federal do Ceará – UFC
Examinadora



Prof. Dr. Fabio Mendonça Diniz
EMBRAPA
Examinador



Profª. Dra. Liliâne Veras Leite Castro
Faculdade de Educação, Ciências e Letras do Sertão Central – FECLESC
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu refúgio em todas as horas.

À minha mãe, Evaneide Alves, por todo amor, dedicação, amizade, paciência e todos os mais lindos sentimentos dedicados a mim todos esses anos, pelo apoio nas minhas decisões e pelo abraço acolhedor nas horas mais difíceis dessa caminhada.

À minha irmã Bianca Alves, que apesar de todos os momentos de brigas pude compartilhar os mais lindos momentos de ajuda (mesmo que forçados), durante todo esse período e por me mostrar que são as diferenças que podem unir pessoas.

À minha tia Jova, por me mostrar que momentos difíceis também devem ser vividos, e que de cada momento da vida seja ele bom ou não se deve tirar algo de bom, algo que te faça crescer e aumente sua fé.

À toda minha família, por sempre estarem presentes na minha vida, por todo apoio e dedicação e por sempre me mostrarem os melhores caminhos a seguir.

À minha prima Raquel Alves, por todos os momentos em que me fez rir e me tirou o desespero de tantas provas que estavam por vir e por me dar o mais lindo presente e afilhado, Ycaro.

Ao meu namorado Pedro, que apesar de ter chegado no final desse processo, me ajudou bastante como todo seu companheirismo, ajuda, cumplicidade e amor que só veio a somar.

As minhas amigas lindas: Cibele, Luana, Amanda, Aldinete, Karen e Juliane por todos os momentos maravilhosos proporcionados durante esse período, por toda paciência e amizade, pelo companheirismo e por me mostrarem o que há de melhor na vida: uma amizade verdadeira.

Ao meu amigo Daniel e ao Felipe, por todo apoio, amizades e momentos maravilhosos.

À Jamille, por toda ajuda, ensinamentos, puxões de orelha e por ter se tornado uma amiga tão incrível, amizade que levarei por toda minha vida. E claro, por ser companheira nas gordices de sempre.

À Mayara Setúbal e a Priscila Almeida, por me ajudarem imensamente em todos os aspectos durante todo esse período, por todos os momentos de aprendizado, vocês são demais.

À minha orientadora, Sandra Salmito, por me mostrar de forma tão apaixonante, logo no segundo semestre, qual área eu iria seguir, por me receber de forma tão acolhedor em seu laboratório me deixando assim fazer parte da família LBRP, por todos os ensinamentos, por dedicar parte do seu limitado tempo para me ajudar nesta pesquisa e por um exemplo de profissional e pessoa a ser seguido.

Ao meu co-orientador, Rodrigo Maggioni, por toda ajuda, motivação, paciência e compreensão. Sem seus ensinamentos esse trabalho não teria sido tão completo. É uma honra enorme trabalhar com o senhor.

À Liliane Veras, por todo o apoio dado durante toda a iniciação científica e o mestrado, pela paciência, pela troca de conhecimentos e por todos os conselhos dados. Com certeza, um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido.

Aos membros da banca, prof. Dr. Fabio Mendonça Diniz, profa Dra. Luciana Magalhães Melo, profa Dra. Liliane Veras Leite-Castro e a profa Dra. Mônica Aline Parente Melo Maciel, por terem aceitado prontamente meu convite e pelas contribuições dadas a este trabalho.

As amigas lindas (sereias do PPGCV), de pós-graduação; Mayara Setúbal, Larissa Teixeira, Júlia Trugílio, Priscila Almeida, Renata Vieira, pela parceria, pela ajuda em todos os momentos de mestrado, pelos momentos de descontração e por todo o laço de amizade que criamos.

Aos amigos e companheiros lindos do CEDECAM, Jamille Martins, Graça Coelho, Renata Pinheiro, Mayara Barreto, Ingrid, Matheus Albuquerque, Fagner Nogueira, Rubens Feijó por toda ajuda dada durante esse período, pelos cafés da manhã e pela amizade sincera que pude construir durante esse período.

Aos alunos de iniciação científica do LBRP Jéssica Castelo Branco, Pedro Arruda, Sayansk Queiroz, Yan Reis e, mais recentemente, Jéssica Uchoa, Jorgeany Bento, Raphael Neres e Thiago Rodrigues, Yasmim Maia, Sayansk Queiroz pela disponibilidade, aprendizado mútuo e momentos de descontração, e em especial ao meu filho científico Pedro Arruda por toda ajuda, companheirismo, a troca de aprendizado, pela disponibilidade de sempre e por ser motivo de orgulho em todos os momentos.

Ao seu César, por sempre está disposto a ajudar em todas as horas. Por todas as vezes que salvou a vida do meu carro, dando uma limpeza geral e pelo o apoio nas minhas dietas.

À Henna, por toda amizade compartilhada durante esse período, pela paciência, alegria, companheirismo, pelos momentos de descontração.

Aos integrantes do Núcleo Integrado de Biotecnologia, pela ajuda mútua e conhecimentos trocados ao longo do mestrado.

Aos colegas da turma de mestrado, pela troca de experiências e conhecimentos.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), pelos conhecimentos e experiências fornecidos ao longo destes dois anos.

À Funcap - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico por ter concedido a bolsa de mestrado.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo suporte financeiro fornecido ao LBRP, possibilitando a realização dos experimentos.

À Universidade Estadual do Ceará, por todo suporte desde a graduação.

RESUMO

O pepino do mar *Holothuria grisea* tornou-se uma espécie de interesse comercial e ecológico, contudo há poucos trabalhos sobre suas características reprodutivas e genéticas. Com isso, o objetivo do trabalho foi caracterizar reprodutiva e geneticamente a espécie de pepino do mar *Holothuria grisea*, prospectar marcadores sexuais em uma população presente no Nordeste Brasileiro. Dois experimentos foram realizados. No experimento 1 foram coletados 100 adultos de *H. grisea* para as análises morfológicas e físico-químicas (coloração, peso, volume, diâmetro tubular e índice gonadais, pH, osmolaridade e concentração gamética) além de análises histológicas. Posteriormente, foram realizadas as análises sobre comportamento reprodutivo gregário em campo, e comportamento de desova em cativeiro. No experimento 2: foram realizadas coletas, no Nordeste Brasileiro e amostras do tecido muscular foram armazenados em álcool 95%. Posteriormente, o DNA foi extraído e sua integridade foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Para obtenção dos microssatélites foi realizado sequenciamento de nova geração com baixa cobertura e posteriormente os reads foram submetidos ao pacote computacional SSR_pipeline. Foram desenhados 15 primers para amplificação de microssatélites selecionados. Os produtos amplificados seguiram para o processo de genotipagem através de eletroforese capilar em sequenciador automático. A identificação de alelo e genótipos foi realizada pelo programa GeneMapper Version 4.0 (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Os perfis e genótipos produzidos foram analisados estatisticamente de acordo com o comportamento dos dados. No experimento 1 observou-se gônadas em estágio maduro e pós-desova, nas análises histológicas. A coloração das gônadas variou entre machos e fêmeas, apesar destes não possuírem dimorfismo externo, de modo que machos apresentaram gônadas de cor creme, as fêmeas de cor rosa. Quanto às características físico-químicas, observou-se que houve pouca variação entre os sexos e variações importantes entre os dois estágios gonadais observados. O comportamento gregário foi pouco evidente na natureza, com razão sexual de 1:1. Durante a desova os animais demonstraram relativa diferença entre os sexos. No experimento 2: dos 15 microssatélites, oito mostraram-se aptos para estudo populacional de *H. grisea*. As heterozigosidades observada e esperada variaram de 0,156 a 0,906 e de 0,283 a 0,774, respectivamente. Foi observado desequilíbrio de Hardy-Weinberg apenas para um locus, assim como a presença de alelos nulos. Nenhuma evidência de desequilíbrio de ligação foi encontrada entre os pares de loci. Apenas o locus Hgr15607 mostrou diferença alélica entre machos e fêmeas. Dessa forma, os dados de caracterização do presente estudo ampliam os conhecimentos sobre a biologia reprodutiva dessa espécie, e podem

ser usados para subsidiar pesquisas sobre desenvolvimento da reprodução em cativeiro e que os marcadores serão úteis para informar estratégias de conservação e exploração pesqueira, assim como para orientar e monitorar a produção destes animais em cativeiro. Diferenças genéticas sugerem que um marcador, o loco Hgr15607, pode estar ligado à determinação do sexo nesses animais.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva. Controle ambiental. Determinação sexual. Marcadores Moleculares.

ABSTRACT

The sea cucumber *Holothuria grisea* has become a species of commercial and ecological interest, however, there are few studies on its reproductive and genetic characteristics. With this, the objective of the study was to characterize the reproductive and genetically the sea cucumber *Holothuria grisea*, for prospecting of sexual markers in a population present in Northeast of Brazil. Two experiments were carried out. In the experiment 1, 100 adults of *H. grisea* were collected for morphological and physicochemical analyzes (coloration, weight, volume, tubular diameter and gonadal index, pH, osmolarity and gametes concentration) and histological analyzes. Subsequently, the analyzes were performed on the gregarious reproductive behavior in the field and the spawning behavior in captivity. In experiment 2, the samples were collected in the Brazilian Northeast and samples of muscle tissue were stored in 95% alcohol. Subsequently, the DNA was extracted and its integrity was evaluated by means of 1% agarose gel electrophoresis. To obtain the microsatellites, a new generation sequencing with low coverage was performed and, later, the readings were sent to the SSR_pipeline computational package. Fifteen primers were designed for amplification of the selected microsatellites. The amplified products followed the process of capillary electrophoresis genotyping in an automatic sequencer. Identification of the allele and genotypes was performed by the GeneMapper Version 4.0 program (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). The profiles and genotypes produced were statistically analyzed according to the behavior of the data. In experiment 1, the gonads were observed in the mature and post-spawn stages, in the histological analyzes. The color of the gonads varied between males and females, although they did not have external dimorphism, so the males presented cream-colored gonads and pink females. Regarding the physical-chemical characteristics, it was observed that there was little variation between the sexes and important variations between the two gonadal stages were observed. Gregarious behavior was not evident in nature, with a sexual ratio of 1: 1. During reproduction, the animals had a relative difference between the sexes. In experiment 2: of the 15 microsatellites, eight were suitable for population study of *H. grisea*. Observed and expected heterozygosity ranged from 0.156 to 0.906 and 0.283 to 0.774, respectively. The Hardy-Weinberg imbalance was observed only for one locus, as well as the presence of null alleles. No evidence of binding disequilibrium was found between the pairs of loci. Only the Hgr15607 locus showed an allelic difference between males and females. Thus, characterization data from the present study extend knowledge about the reproductive biology of this species and can be used to support research on the development of captive breeding and the markers will be useful

for informing strategies for conservation and exploitation of fisheries, to guide and monitor the production of these captive animals. Genetic differences suggest that a marker, the locus Hgr15607, may be linked to sex determination in these animals.

Keywords: Environmental control. Genomic library. Molecular markers. Reproductive biology. Sexual determination.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	CLASSE HOLOTHUROIDEA	14
2.2	ESPÉCIE: <i>Holothuria grisea</i>	15
2.3	MARCADORES MOLECULARES.....	16
2.4	MICROSSATÉLITES	18
2.5	IDENTIFICAÇÃO SEXUAL EM PEPINOS DO MAR.....	20
3	JUSTIFICATIVA.....	22
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	24
5	OBJETIVOS.....	25
5.1	GERAL.....	25
5.2	ESPECÍFICOS.....	25
6	CAPÍTULO 1.....	26
7	CAPÍTULO 2.....	47
8	CONCLUSÕES GERAIS.....	65
9	PERSPECTIVAS.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Pepinos do mar são invertebrados marinhos pertencentes ao filo Echinodermata que não possuem dimorfismo sexual, são dioicos e de fecundação externa. São animais bentônicos geralmente estabelecidos em recifes, algas, areias e, em alguns casos, no mangue. Alimentam-se de detritos e material orgânico do sedimento, participando da reciclagem do ambiente marinho, promovendo a bioturbação e auxiliando no equilíbrio do pH da água, processos importantes para a sobrevivência de corais e outros seres vivos (CONAND, 2006).

Esses animais são amplamente consumidos no mercado Asiático, principalmente China e Japão, sendo usado na culinária e medicina tradicional chinesa (UTHICKE; CONAND, 2005). Nos últimos anos, a crescente demanda de pepino do mar não vem sendo acompanhada pela oferta, o que gerou um aumento do preço internacional do produto (ALKAMINE, 2001) e, conseqüentemente, o aumento da pesca predatória gerando a diminuição dos estoques naturais das espécies mais comercializadas (ROBINSON; LOVATELLI, 2015).

Na costa brasileira a espécie mais abundante é a *Holothruia grisea*, encontrada desde o sul do estado de Santa Catarina até a região Nordeste (TOMMASI, 1969; MENDES; MARENZI; DOMENICO, 2006). Devido à diminuição dos estoques de pepino do mar na Ásia, a *H. grisea* tornou-se uma espécie comercial alternativa, impulsionando a captura desordenada no Brasil. Além disso, esta espécie tem despertado um grande interesse comercial no país devido ao seu grande potencial biotecnológico como fonte de moléculas bioativas para indústria farmacêutica. Várias moléculas extraídas de *H. grisea* que possuem atividade biológica vêm sendo descritas (MOURÃO, 2004; SUN et al., 2008; MOURA et al., 2013; MELO et al., 2014).

As questões ecológicas e econômicas citadas acima impulsionam pesquisas sobre a produção sustentável de pepinos do mar em cativeiro, visando o repovoamento de áreas afetadas (DABBAG; SEDAGHAT, 2012), o suprimento do mercado (FUJIWARA et al., 2010), bem como por conhecimentos genéticos das espécies em estudo.

De fato, o conhecimento sobre a caracterização reprodutiva e genética são importantes para o desenvolvimento da reprodução assistida e, por conseguinte, para o sucesso da aquicultura, com uma produção sustentável de biomassa desses animais e diminuição da pressão pesqueira sobre os estoques naturais. Os estudos da genética e estrutura populacional são fundamentais para os programas de conservação de espécies em situação de risco, como *Holothruia grisea*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSE HOLOTHUROIDEA

A classe Holothuroidea, pertence ao filo Echinodermata e compreende cerca de 1.400 espécies distribuídas em seis ordens distintas: Apodida, Elasipodida, Aspidochirotida, Molpadiida, Dendrochirotida e Dactylochirotida (PAWSON, 2007) que se propagaram por maior número de habitats marinhos que qualquer outro grupo de equinodermas (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). No Brasil há registros de 5 destas ordens compreendendo 32 espécies (TOMMASI, 1969; HADEL *et al.*, 1999). Dentre estas, a ordem Aspidochirotida compreende três famílias, Synallactidae, Stichopodida e Holothuriidae (TOMMASI, 1969; PAWSON, 1982) com aproximadamente 340 espécies, das quais 7 apresentam ocorrência no litoral Brasileiro.

Os representantes da classe Holothuroidea caracterizam-se por apresentar morfologia distinta dos demais equinodermatas (LAWRENCE, 1987), pois apresentam o corpo em formato cilíndrico, achatado ou em formato de U, sendo essas formas resultantes de um eixo polar alongado (HENDLER, 1995). Os membros dessa classe, apresentam ainda, redução do esqueleto a ossículos microscópios, pés ambulacrários e tentáculos (LAMBERT, 1997). Em sua maioria esses animais são dioicos, sem dimorfismo sexual e de fecundação externa (CONAND, 2006), no entanto foi relatada reprodução assexuada em algumas espécies (UTHICKE; CONAND, 2004).

Os membros dessa classe são bentônicos e podem ser encontrados vivendo sobre ou sob rochas, em fendas e alguns cavam sob lama ou areia, podendo assim, serem encontrados na superfície ou em grandes profundidades (PAWSON, 1966). Alimentam-se de detritos e material orgânico do sedimento e participam assim do processo de bioturbação que auxilia no equilíbrio do pH da água, ou seja, da reciclagem do ambiente marinho. Este processo é importante para a sobrevivência dos corais e outros seres vivos (CONAND, 2006), uma vez que estes animais podem processar várias toneladas de sedimento por ano em certas áreas (UTHICKE, 1999).

Além dessa importância ecológica, as holotúrias destacam-se no âmbito farmacêutico. Esse destaque se dá pelo isolamento de diversas moléculas bioativas que apresentam atividades hemolíticas (HATAKEYAMA; NAGAMOTO; YAMASAKI, 1995; YOSHIDA *et al.*, 2007), antitumorais (PETZELT, 2005), anti-inflamatórias (HERENCIA *et al.*, 1998), antibacterianas (KUZNETSOVA *et al.*, 1982) e antifúngicas (PETZELT, 2005). No entanto, as holothurias são usadas há muitos anos na medicina tradicional asiática e na culinária

(CONAND, 1990), sendo assim amplamente consumidas nos países asiáticos, principalmente China e Japão (UTHICKE; CONAND, 2005). Esses fatores vêm ocasionando uma crescente demanda de pepino do mar em todo o mundo gerando o aumento do preço internacional do produto (ALKAMINE, 2001) e o aumento da pesca predatória, com a diminuição dos estoques naturais das espécies mais comercializadas (ROBINSON E LOVATELLI, 2015).

No Brasil a família que mais se destaca é a família Holothuroidea, sendo composta de um grande número de espécies que vivem em águas tropicais. Essas espécies são de tamanho médio a grande, com cerca de 20 tentáculos em forma de escudo e pés ambulacrários dispostos de forma irregular e mais abundante na região ventral do corpo (DEICHMANN, 1958). Segundo Oliveira e Christoffersen (2012), na região Nordeste do Brasil, foram registradas até o momento três espécies pertencentes a família Holothuroidea: *Holothuria grisea*, *Holothuria arenicola* e *Holothuria parvula*, sendo a primeira a mais abundante na costa brasileira.

2.2 ESPÉCIE: *Holothuria grisea*

Classe: Holothuroidea

Ordem: Aspidochirotida

Família: Holothuriidae

Gênero: *Holothuria*

Espécie: *Holothuria grisea*

A *H. grisea* encontra-se distribuída em vários locais ao redor do mundo: Flórida, Tortugas, Bahamas, Porto Rico, Jamaica, Colômbia, Curaçao, Panamá, Brasil e costa oeste da África (HENDLER et al, 1995). No Brasil esta é a espécie mais abundante, estando distribuída da região Nordeste até o sul de Santa Catarina (TOMMASI, 1969; MENDES; MARENZI; DOMENICO, 2006).

No Ceará essa espécie foi registrada nas seguintes praias: Praia do Mucuripe e Meireles (LIMA-VERDE, 1969), Praia do Pacheco, Praia do Farol, Praia de Peroba, Praia de Caetano e Praia de Bitupitá (DIAS, 2009).

Animais pertencentes a essa espécie caracterizam-se por apresentar uma cor que varia do castanho escuro ao cinza avermelhado com papilas e manchas avermelhadas. Indivíduos dessa espécie não se diferenciam muito de outras holotúrias, apresentando um corpo cilíndrico, pés ambulacrários, que ajudam na fixação desses animais, e a boca rodeada de tentáculos (DIAS, 2012) (Figura 1). Esses animais são conhecidos como *gray sea cucumber* (pepino do mar cinzento) devido a sua coloração cinza escuro com variações de vermelho

amarelado, com manchas marrons. As papilas do dorso são esbranquiçadas com pontas amarelas, os pés ambulacrários amarelos, e a coroa de tentáculos amarelos do tipo peltado, característico da ordem, ao redor da boca (HENDLER et al, 1995).

Figura 1- *Holothuria grisea* adulto coletado na praia de Bitupitá (Barroquinha/CE).



Fonte: LEITE-CASTRO, 2015

Essa espécie é normalmente encontrada em áreas rasas intertidais em profundidade de cinco metros, abaixo das rochas e fixados na areia, e ficam completamente expostos durante a maré baixa e encontram-se normalmente agrupados (TOMMASI, 1969; ROCHA, 2005; MENDES; MARENZI; DOMENICO, 2006; COSTA, 2010).

Atualmente, com a crescente demanda da biomassa de pepinos do mar e a superexploração das espécies asiáticas (ROBINSON; LOVATELLI, 2015), a *H. grisea* tem se tornado uma espécie comercial alternativa o que vem impulsionando sua captura desordenada. Além desse aspecto, esta espécie tem mostrado alto potencial biotecnológico para indústria farmacêutica. Várias moléculas extraídas de *H. grisea* que possuem atividade biológica vêm sendo descritas, como citotoxicidades potentes contra células tumorais humanas (SUN et al., 2008); anti-inflamatória (Lectina HGA) (MOURA et al., 2013); hemaglutinante (Lectina HGA-2) (MELO et al., 2014) e com ação anticoagulante (condroitina sulfatada) (MOURÃO, 2004). Dessa forma, para atender as necessidades farmacêuticas, o projeto PEPMAR foi desenvolvido e conta com parcerias entre as universidades (Estadual e Federal do Ceará, sendo as principais) e a empresa Cristália: Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, visando produção insumos biotecnológicos a partir da biomassa de pepipno do mar *H. grisea*.

Poucos estudos são relatados sobre a espécie *H. grisea*, de forma que, sobre a genética e determinação do sexo dessa espécie não há relatos na literatura, assim esse projeto está inserido no projeto PEPMAR, visando determinar geneticamente o sexo de *H. grisea* e caracterizá-lo morfológicamente e reprodutivamente.

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são segmentos de DNA que estão fisicamente ligados a locus que determinam características de interesse. Eles fornecem informações sobre o material genético dos indivíduos em estudo, com o emprego de técnicas bioquímicas que são capazes de identificar diferenças diretamente no DNA (AVISE, 2004).

Liu (1998), afirma que um marcador molecular é tipicamente uma pequena região do DNA que irá mostrar polimorfismo (diferenças) entre os organismos, sendo de grande potencial no melhoramento genético, uma vez que são praticamente ilimitados em número e de fácil detecção, além de se comportarem como “caracteres” de herança simples e previsível, não sendo afetados pelo meio (ALZATE-MARIN et al., 2005) e, geralmente, não possuem efeitos pleiotrópicos sobre os loci de caracteres quantitativos (QTLs) (TENEVA, 2009). Esses marcadores são distribuídos por todo o genoma, possuem herança mendeliana e geralmente expressam caráter codominante e muitas vezes são multialélicos (YANG et al., 2013).

A utilização dos marcadores moleculares nas pesquisas científicas tem objetivos muito diversos. Seu uso tem auxiliado pesquisas sistemáticas envolvendo a caracterização molecular e identificação de espécies, nos estudos biogeográficos, na produção (por meio do melhoramento genético), na identificação de características genéticas específicas de animais e plantas, no monitoramento genético e manejo de espécies (mediante análise da variabilidade genética), na análise de pedigree e endogamia, na área da profilaxia (por meio do diagnóstico de doenças infecciosas, genéticas e na identificação de predisposições a doenças), na identificação genética do sexo, na análise de distância genética e reconstrução de relações filogenéticas, na identificação de indivíduos híbridos e aplicações para reconstrução de genealogias (AVISE, 2004; GASQUES; BELONI; OLIVEIRA, 2013).

Dessa forma, eles podem revelar parâmetros genéticos fundamentais para a conservação e o melhoramento de espécies, auxiliando no manejo reprodutivo, entre outras finalidades (ALMEIDA, 2012). Com isso, a utilização de marcadores genéticos possibilita a avaliação da variabilidade genética existente dentro e entre espécies distintas (POLIDO et al., 2012).

Os marcadores moleculares, foram assim denominados, inicialmente, para se referirem ao uso de isoenzimas e, nos últimos anos vem se baseando em sequências de DNA, tendo este último um destaque em relação aos demais, e por este motivo um grande número de diferentes tipos de marcadores tem sido validado (GASQUES; BELONI; OLIVEIRA, 2013). Entre os marcadores que se baseiam na análise do DNA genômico, estão o RAPD (Random

Amplified Polymorphic DNA), o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), os STS (Sequence Tagged Site), os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), PCR (Polymerase Chain Reaction) com primers específicos, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), QTL (Quantitative Trait Locus), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (BOREM; CAIXETA, 2006; BUSO, 2005), ou polimorfismo de DNA amplificados ao acaso, o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre esses marcadores citados acima, tem destaque a caracterização de microssatélites, que são marcadores moleculares codominantes e altamente polimórficos, conhecidos por sua eficiência na determinação de estruturas populacionais genéticas (MAGGIONI; ROGERS, 2002; DINIZ et al., 2004; 2005).

2.4 MICROSSATÉLITES

Os microssatélites são marcadores moleculares que consistem de pequenas sequências, com 2 a 6 pares de base repetidas em tandem (lado a lado), amplamente distribuídos nos genomas de procaríotos e eucaríotos (BECKMANN; WEBER, 1992; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Segundo Marques (2009) este tipo de marcador tem sido bastante utilizado em estudos genéticos, incluindo a genética de conservação e o melhoramento genético. O fato dos marcadores microssatélites serem bastantes utilizados dá-se, pois, os mesmos são codominantes, mutialélicos, terem alta reprodutibilidade e resolução, além de serem baseados na Polymerase Chain Reaction (PCR) (SCHOLOTTERER, 1998). O sucesso do uso de marcadores, pode se dar também pela sua abundância e seu alto grau de polimorfismo que pode ser facilmente detectado, além da sua herança mendeliana (MARTINS, 2007).

Além disso, marcadores microssatélites têm-se revelado uma eficiente ferramenta para avaliar o nível de variação genética das unidades populacionais de incubação e atribuição de filiação em muitos animais (NORRIS; BRADLEY; CUNNINGHAM, 2000).

Segundo Moore et al. (1991) o surgimento e a evolução dos microssatélites estão relacionados com mecanismos como a inserção/substituição de bases, *slippage*, mutação e *crossing-over* desigual, sendo esses marcadores encontrados em regiões codificadoras, não codificadoras e íntrons do genoma (LIU, 2006). Os microssatélites podem ser classificados de acordo com o número de nucleotídeos nas repetições, podendo ser mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos (MARQUES, 2009). De modo que, os trinucleotídeos e os hexanucleotídeos, são mais

predominantes nas regiões codificantes, devido à seleção negativa para mutações na região de leitura dos códons (MORGANTE; HANAFEY; POWEL, 2002). Esses marcadores podem ser classificados ainda como, perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos (OLIVEIRA et al., 2006).

Microssatélites possuem sequências de DNA que os flanqueiam e que geralmente são bem conservadas, permitindo o desenho de *primers* e sua utilização para a amplificação dos *loci* microssatélites (POLIDO et al, 2012). Cada microssatélite constitui um *locus* altamente polimórfico, cujas variações no número de repetições determinam diferentes alelos que podem ser separados por eletroforese para acessar o perfil de cada indivíduo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Dessa forma segundo Diniz et al (2004), o polimorfismo de microssatélites pode ser detectado pela amplificação do locus via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados podem ser visualizados usando a coloração com nitrato de prata, autoradiografia ou por meio do sequenciamento do locus após PCR com primers marcados com fluorocromos, sendo a última opção a mais usada atualmente.

A técnica envolvendo microssatélites necessita de tempo, além de ter um alto custo financeiro. No entanto, segundo Martins (2007), atualmente várias estratégias alternativas de isolamento de microssatélites vêm sendo desenvolvidas, a fim de diminuir o tempo de execução e os custos.

Métodos como sequenciamento de nova geração (NGS) vem sendo usados para facilitar o desenvolvimento de marcadores, incluindo microssatélites. Além de estar revolucionando a ecologia molecular e simplificando o desenvolvimento da genética molecular, facilitou ainda o estudo da expressão gênica, a regulação genética e as redes de genes nos animais modelos e não-modelos (PARCHMAN et al., 2010; SUN et al., 2010; GARDNER, 2011)

Com isso, os microssatélites já foram desenvolvidos a partir de NGS para 54 espécies não modelos e essa técnica mostrou-se eficaz para desenvolvimento destes, evidenciando diferenças entre as espécies estudadas (GARDNER, 2011). Em pepinos do mar, pesquisas com *Apostichopus japonicus* e *Holothuria scabra*, já foram desenvolvidos para estudo de transcrito e desenvolvimento de microssatélites a partir de NGS (DU et al., 2012; FITCH, 2012).

Marcadores microssatélites a partir de sequenciamento de primeira geração também vêm sendo utilizado para algumas espécies de pepino do mar (Tabela 1). Kanno et al (2006) investigaram a relação entre as cores da espécie *Apostichopus japonicus* utilizando onze

marcadores microssatélites, pré-selecionados de vinte microssatélites de um estudo anterior do mesmo autor.

Chen, Li, Yang (2008), utilizaram oito marcadores microssatélites para avaliar a divergência genética de duas variedades de *Apostichopus japonicus*, a fim de comparar o grau de diferenciação genética entre elas. Dessa forma, Kanno et al (2006) concluíram que o teste de segregação mendeliana confirma a utilidade de marcadores microssatélites como marcadores genéticos em pepinos do mar.

Tabela 1- Dados de caracterização de microssatélites para espécies de pepino do mar

	Espécies				
	<i>Parastichopus</i>	<i>Apostichopus</i>	<i>Apostichopus</i>	<i>Apostichopus</i>	<i>Holothuria</i>
	<i>clifornicus</i>	<i>japonicus</i>	<i>japonicus</i>	<i>japonicus</i>	<i>scabra</i>
H_o	0,422	0,56	0,601	0,298	0,461
H_e	0,768	0,61	0,643	0,640	0,624
N_a	3-14	2-15	9.3	3-10	2-28
N_e	-	-	-	-	-
HWE	-	-	-	-	0,160
F_{IS}	-	-	0.064	-	-
Referência	1	2	3	4	5

Fonte: Elaborada pelo autor

H_o , heterozigidade observada; H_e , heterozigidade esperada; N_a , número de alelos detectados; N_e , número efetivo de alelos; HWE, probabilidade associada ao equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{IS} , índice de endocruzamento de Wright.

¹NELSON et al., 2002; ²KANNO; LI; KIJMA, 2005; ³KANNO et al., 2006; ⁴CHEN; LI, 2007; ⁵FITCH et al., 2012

2.5 IDENTIFICAÇÃO SEXUAL EM PEPINOS DO MAR

Os equinodermos, em geral, possuem um nível muito elevado de capacidade regenerativa e, conseqüentemente, vários modos de reprodução assexuada são conhecidos na maioria das classes (EMSON; WILKIE 1980; EBERT, 1983; LAWRENCE; HERRERA 2000).

Em pepinos do mar, há oito espécies da classe aspidochirotida que apresentam reprodução assexuada por fissão transversal (UTHICKE, 1997; CONAND; MOREL; MUSSARD, 1997). De modo que, estas holotúrias estão entre os poucos invertebrados marinhos com reprodução assexuada (JACKSON, 1985). A reprodução assexuada não acontece

em todas as espécies de pepino do mar, e em sua maioria estão associadas a reprodução sexuada (CHAO; CHEN; ALEXANDER, 1993; UTHICKE, 2001A).

Quando se trata de reprodução sexuada, eles são dioicos e de fecundação externa (CONAND, 2006), de forma que, muitos desses animais não possuem dimorfismo sexual e sua identificação sexual se dá por meio de dissecação, observação da coloração das gônadas e por análises microscópicas.

Na espécie, *H. grisea*, os animais são dioicos, não havendo comprovação de reprodução assexuada, e os sexos são classificados quanto a cor das gônadas, de modo que, machos apresentam gônadas cor creme e fêmeas cor rosa (Figura 2a e 2b, respectivamente) (LEITE-CASTRO et al, 2016).

Figura 2- Macho (A) e fêmea (B) de *H. grisea* dissecados. Estão expostas as gônadas (*) junto à parede do corpo e o tubo digestivo



Fonte: LEITE-CASTRO, 2015

Dessa forma, faz-se necessários estudos mais aprofundados que busquem determinar o sexo desses animais por meio de estudos genéticos que objetivem, ainda, encontrar marcadores ligados ao sexo. Vale ressaltar que, não há relatos na literatura sobre estudos genéticos voltados para determinação do sexo nessa espécie.

3 JUSTIFICATIVA

Os pepinos do mar têm sido super-explorados para suprir a demanda do mercado asiático e a indústria farmacêutica, uma vez que esses animais apresentam potencial biotecnológico devido à presença de moléculas bioativas. Essa alta demanda, que não vem sendo acompanhado pela oferta, vem gerando a diminuição dos estoques naturais de pepino do mar em todo mundo.

Com isso, a espécie *H. grisea*, abundante no Brasil, tornou-se alvo da pesca ilegal ameaçando a sustentação desse importante integrante da fauna marinha da costa brasileira. As holothurias, constituem-se como um importante componente dos ambientes marinhos, uma vez que são conspícuos e desempenham papéis ecológicos importantes como bioturbação, dinâmica sedimentar e ciclagem de nutrientes. Estes são também equinodermos suscetíveis de desempenhar uma função importante nos recifes de corais como resiliência em face ao estresse da mudança climática.

Além dessa importância ecológica, no Brasil há interesse em desenvolver um novo medicamento antitrombótico a partir de biomassa de *H. grisea* (Cristália - Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda) aumentando a necessidade de conservação desse recurso, uma vez que a captura desordenada de *H. grisea* no Nordeste do Brasil, pode levar a diminuição de estoques naturais que são geneticamente adaptados a um determinado meio. Tal fato, pode levar a perda da biodiversidade genética dessa espécie.

Dessa forma, estudos sobre a reprodução e genética desses animais vem sendo impulsionados, visando o repovoamento de área afetadas, bem como a produção de pepino do mar em cativeiro. Assim, a produção sustentável do pepino do mar torna-se um fator crucial tanto para suprir o mercado quanto para restaurar populações selvagens.

Assim, estudos sobre a variabilidade genética, incluindo a busca por marcadores sexuais, poderão contribuir para conservar a espécie, uma vez que as populações geneticamente distintas possuem características biológicas diferentes e poderão ainda facilitar o reconhecimento sexual dessa espécie. Além disto, poderão otimizar o manejo reprodutivo em cativeiro, no qual torna-se necessária a identificação genética, tendo em vista que essa espécie não possui dimorfismo sexual.

O sucesso da aquicultura e a produção sustentável de biomassa desses animais, também são importantes para a conservação dessa espécie, sendo importante a caracterização e manipulação das gônadas e dos gametas, a fim de buscar métodos que objetivem a diminuição da pressão sobre os estoques naturais.

Dessa forma, esses estudos podem revelar parâmetros genéticos e morfológicos fundamentais para o melhoramento e a conservação de espécies, auxiliando no manejo reprodutivo, entre outras finalidades. Com isso, a utilização de marcadores genéticos e os estudos das características reprodutivas possibilitam a avaliação da variabilidade existente dentro e entre espécies distintas.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Não existe dimorfismo sexual externo entre os animais de pepino do mar *H. grisea*, porém diferenças morfológicas podem ser observadas após a dissecação;

O sequenciamento de nova geração apresenta sucesso para prospecção de marcadores microssatélites;

Existem marcadores microssatélites ligados ao sexo no pepino do mar *H. grisea*.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Caracterizar reprodutiva e geneticamente a espécie de pepino do mar *Holothuria grisea*, prospectar marcadores sexuais em uma população presente no Nordeste Brasileiro.

5.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar as gônadas e gametas, bem como o comportamento reprodutivo de machos e fêmeas de *H. grisea*;

Isolar e caracterizar sequências de microssatélites no genoma de *H. grisea*, através de sequenciamento de nova geração;

Prospectar marcadores sexuais dentre os marcadores identificados.

6 CAPÍTULO 1

Caracterização gonadal, gamética e do comportamento reprodutivo do pepino do mar (Holothuria grisea) (Selenka 1987)

Periódico: Pesquisa Agropecuária Brasileira (Submetido em 16 de junho de 2017)
Qualis: B2

**Caracterização gonadal, gamética e do comportamento reprodutivo do pepino do mar
(*Holothuria grisea*) (Selenka 1987)**

Vanessa Alves Pereira⁽¹⁾, Liliane Veras Leite Castro⁽²⁾, José de Souza Júnior⁽³⁾ e Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Av. Dr. Silas Munguba, nº 1700, Itaperi, CEP: 60.714-903, Fortaleza, CE, Brasil. Email: vanessabio35@gmail.com

⁽²⁾ Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de educação, ciências e letras do sertão central, FECLESC, Quixadá, CE, Brasil Email: lilianeveras.bio@gmail.com

⁽³⁾ Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Avenida Mister Hull, s/n, Pici, CEP: 60455-760, Fortaleza, CE, Brasil. Email: jr_pescaufc@yahoo.com.br

⁽⁴⁾ Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Av. Dr. Silas Munguba, nº 1700, Itaperi, CEP: 60.714-903 Fortaleza, CE, Brasil. Email: sandra.salmito@uece.br

Resumo- O pepino do mar *Holothuria grisea* tornou-se uma espécie de interesse comercial e ecológico, contudo há poucos estudos sobre suas características reprodutivas. O objetivo desse trabalho foi caracterizar os aspectos comportamentais, gonadais e gaméticos de machos e fêmeas dessa espécie. Foram coletados 100 adultos de *H. grisea* para as análises morfológicas e físico-químicas (coloração, peso, volume, diâmetro tubular e índice gonadais, pH, osmolaridade e concentração gamética) além de análises histológicas das gonadas. Posteriormente, foram realizadas as análises sobre comportamento reprodutivo agregativo em campo, e comportamento de desova em cativeiro. Nas análises histológicas, observou-se gônadas em estágio maduro e pós-desova. A coloração das gônadas variou entre machos e fêmeas, apesar destes não possuírem dimorfismo externo, de modo que machos apresentaram gônadas de cor creme as fêmeas de cor rosa. Quanto às características físico-químicas, observou-se que houve pouca variação entre os sexos, e variações importantes entre os dois estágios gonadais observados. O comportamento agregativo foi pouco evidente na natureza, com razão sexual de 1:1. O comportamento de desova demonstrou relativa diferença entre os sexos. Os dados de caracterização do presente estudo ampliam os conhecimentos sobre a biologia reprodutiva dessa espécie, e podem ser usados para subsidiar pesquisas sobre desenvolvimento da reprodução em cativeiro.

Termos para indexação: Aquicultura, Biologia reprodutiva, Dimorfismo sexual, Equinodermas, Fatores ambientais.

**Gonadal characterization, gametes and reproductive behavior of the sea cucumber
(*Holothuria grisea*) (Selenka, 1987)**

Abstract- The sea cucumber *Holothuria grisea* has become a species of commercial and ecological interest, however, there are few studies on its reproductive characteristics. The objective of this work was to characterize the behaviors, gonadal and gametes of males and females of this species. 100 adults of *H. grisea* were collected for morphological and physicochemical analyzes (coloration, weight, volume, tubular diameter and gonadal index, pH, osmolarity and gametes concentration) and histological analysis. Subsequently, analyzes were performed on aggregate reproductive behavior in the field and spawning behavior in captivity. In the histological analyzes, the gonads were observed in mature stages and post-spawning. The color of the gonads varied between males and females, although they did not have external dimorphism, presenting colored gonads, so that males presented cream color and pink females. Regarding the physical-chemical characteristics, it was observed that there was little variation between the sexes and important variations between the two gonadal stages observed.

Aggregative behavior was not evident in nature, with sexual intercourse of 1: 1. Reproductive behavior showed a relative difference between the sexes. The characterization data of the present study extend knowledge about a reproductive biology of the species and can be used for future research on the development of captive breeding.

Index terms: Aquaculture, Echinoderms, Environmental factors, Reproductive biology, Sexual dimorphism.

Introdução

Os pepinos do mar (classe Holothuroidea) são animais bentônicos geralmente estabelecidos em recifes, algas, associada a areias e, em alguns casos, no mangue. Caracterizam-se por serem dioicos, e de fecundação externa, ou seja, os gametas são liberados na coluna d'água, onde ocorre a fecundação (Mercier & Hamel, 2009).

Esses animais possuem extrema importância no mercado asiático, principalmente, na China e no Japão, uma vez que são vastamente consumidos na culinária local e fazem parte da medicina tradicional chinesa (Fabinyi, 2012; To & Shea, 2012). No Brasil, o pepino do mar não é consumido de forma significativa, porém, nos últimos anos, surgiu um grande interesse para a sua produção em cativeiro diante do alto potencial biotecnológico, principalmente para a indústria farmacêutica (Moura et al., 2013). A espécie mais estudada no país e a mais abundante na costa brasileira, é a *Holothuria grisea*, sendo encontrada do Nordeste ao sul de Santa Catarina (Tommasi, 1969; Mendes et al., 2006).

Essa espécie tornou-se uma alternativa comercial, impulsionando a pesca ilegal no Brasil, uma vez que há uma crescente redução dos estoques de pepino do mar na Ásia. Tal declínio está associado ao crescimento da demanda de pepino do mar que não vem sendo acompanhado pela oferta. Isto gerou um aumento do preço internacional, deixando-os vulneráveis à sobre-exploração e esgotamento dos estoques naturais (Purcell et al., 2013). Dessa forma, estudos sobre a reprodução desses animais vem sendo impulsionados, visando o repovoamento de áreas afetadas bem como a produção de pepino do mar em cativeiro (Dabbag & Sedaghat, 2012). Assim, a produção sustentável do pepino do mar torna-se um fator crucial tanto para suprir o mercado quanto para restaurar populações selvagens (Fujiwara et al., 2010).

No litoral cearense essa espécie possui como características reprodutivas, um padrão reprodutivo cíclico, mostrando assim, um padrão sazonal da gametogênese com um período de desova de quatro meses de dezembro a março (Leite-Castro et al., 2016). No sul do Brasil, essa espécie é caracterizada por possuir desova no mês de junho (Bueno et al., 2015). Estes são os únicos estudos que podem subsidiar o desenvolvimento da sua aquicultura.

Contudo, tais estudos são mais focados na elucidação do ciclo reprodutivo dessa espécie na natureza, com pouca ênfase na caracterização gonadal e gamética. Tais dados de caracterização são importantes para o desenvolvimento de processos que necessitem da manipulação das gônadas e dos gametas, tais como a reprodução assistida para o sucesso da aquicultura. Este visa uma produção sustentável de biomassa desses animais e diminuição da pressão sobre os estoques naturais. Assim, o trabalho objetivou caracterizar as gônadas e gametas, bem como o comportamento reprodutivo de machos e fêmeas de *H. grisea*.

Material e métodos

Amostragens

Foram coletados 100 adultos de *H. grisea*, com peso do corpo total superior a 90 g na praia de Bitupitá, localizada no litoral do município de Barroquinha-Ce (02°47'43.38"S, 041°14'33.02"W). Os pepinos do mar foram coletados manualmente ao longo de três meses, na estação reprodutiva, durante a maré baixa. Posteriormente, eles foram transportados ao laboratório localizado à ~ 20 min do local de coleta. As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Ministério de Meio Ambiente / MMA; com número 22.742-1). Imediatamente após a chegada ao laboratório, cada indivíduo foi pesado em balança de precisão analítica e posteriormente dissecado longitudinalmente desde a boca até o ânus e as vísceras removidas. As gônadas foram isoladas de outros órgãos e colocadas sobre um papel toalha para remover o excesso de água, e foram utilizadas para a caracterização da morfológica gonadal e gamética.

Caracterização cromática dos sexos e razão sexual

As gônadas foram analisadas quanto a sua coloração, uma vez que aqueles animais que possuíam gônadas de cor rosa eram considerados fêmeas, e os que tinha gônadas cor creme foram considerados machos, segundo classificação de Leite-Castro et al., (2016). A partir desses números, foi calculada a razão sexual. Dos 100 animais, foram selecionados 45 machos e 45 fêmeas para serem utilizados nas análises posteriores.

Índice Gonadal (IG)

A parede do corpo eviscerado e a gônada de cada animal foram pesadas utilizando balança digital de precisão. O índice gonadal foi estabelecido como a razão percentual do peso úmido da gônada pelo peso úmido da parede do corpo eviscerado.

Peso e volume das gônadas

Essas gônadas foram pesadas em balança de precisão. A gônada de cada animal foi então colocada em tubo graduado contendo água, e seu volume foi estabelecido pelo deslocamento da água no tubo.

Diâmetro dos túbulos

Para determinação dessa medida foi utilizado um paquímetro digital, de modo que três medidas de túbulos aleatórios de cada indivíduo foram levadas em consideração (Leite-Castro et al., 2016).

Morfologia dos gametas

Para a coleta dos gametas, foram utilizados três túbulos gonadais de cada animal, a partir dos quais 100 μ L de sêmen ou ova foram coletados. Para isso, o túbulo foi cortado com bisturi e feito uma leve massagem para esvaziar o túbulo e coletar as amostras de gametas. Estas foram armazenados em 1 mL de água do mar formalizada a 4% na proporção de 1:10 (gametas: fixador). No caso dos machos, foi feito esfregaço com 15 μ L do sêmen fixado e 3 μ L de corante azul de bromofenol e observados em microscópio ótico (aumento 400x). No caso das fêmeas,

10 µL do fixado foi colocado sob lamínula e observados em microscópio ótico (aumento 200x). Vinte gametas de cada lâmina foram escolhidos aleatoriamente e o diâmetro das células foi medido em microscópio de luz e analisadas com um sistema de imagens (Leica Application Suite - LAS - Versão 4.0.0 Copyright© 2003-2011) (Leite-Castro et al., 2016).

Osmolaridade, pH e concentração

A partir das amostras removidas das gônadas masculinas, a osmolaridade e o pH do sêmen foram determinados por osmômetro digital Peltier cooling (Roebing, Germany) e fitas de pH (Merck, Germany), respectivamente. A concentração espermática foi verificada por meio de câmara de Neubauer.

Histologia das gônadas

A histologia das gônadas foi realizada utilizando três túbulos gonadais de cada indivíduo, no qual foram fixados em água do mar formolizada a 4% durante 12 h e, em seguida, transferidos para etanol 70% para armazenamento. As amostras fixadas foram processadas utilizando método padrão: desidratação (por meio de uma série graduada de etanol a 80, 90 e 100%), diafanização (três banhos de xilol PA), impregnação em parafina (ERV-Plast) e emblocamento. Seis secções (3-5 µm) foram coradas com Tricrômico de Gomori e analisadas por microscopia ótica. Os estágios da gametogênese foram classificados segundo Leite-Castro et al., (2016).

Caracterização do comportamento gregário em campo

Durante as coletas, o comportamento gregário dos animais em campo foi observado. Os indivíduos encontrados sob a mesma rocha foram considerados grupos, de modo que o número de indivíduos em cada grupo e a razão entre os sexos foram registrados. O comportamento gregário foi classificado como: grupos com mais de três indivíduos; grupos com três indivíduos; duplas ou indivíduos isolados.

Comportamento reprodutivo durante a desova

Trinta indivíduos adultos foram coletados e transferidos ao laboratório para indução da desova em cativeiro por meio de choque térmico (Leite-Castro et al., 2016). Para tanto, foi adicionado gelo resfriando a água até 5°C abaixo da temperatura natural por uma hora. Posteriormente, a temperatura foi elevada 5° C por meio de adição de água aquecida, retornando a temperatura natural. Para caracterização do comportamento reprodutivo foi observado o movimento do corpo, a ereção dos animais, a estrutura do gonoporo, a semelhança no comportamento de machos e fêmeas e a sincronia da desova. Essa análise foi repetida uma vez por mês durante os três meses.

Dados ambientais

Os dados de precipitação ao longo dos três meses foram obtidos por meio do site da FUNCEME (<http://www.funceme.br/index.php/areas>). Os dados de concentração de clorofila-a foram obtidos a partir de satélite de monitoramento do oceano (disc.sci.gsfc.nasa.gov/Giovanni; thredds.jpl.nasa.gov/las/getuI.do)

Resultados e discussão

Dos 100 animais coletados, 54 eram fêmeas e 46 eram machos, revelando a proporção de 1:1. Essa proporção é observada na maioria das holotúrias da classe Aspidochirotida, no entanto pode haver um desequilíbrio, normalmente, em espécies que possuem reprodução assexuada (Shiell & Uthicke, 2006). No caso de *H. grisea*, não foi encontrado nenhum indício de reprodução assexuada.

O peso médio do corpo eviscerado foi $55,6 \pm 11,5$ g, sendo semelhante entre os sexos ($56,1 \pm 11$ g para fêmeas e $54,4 \pm 12$ g para machos). O peso mínimo da maturidade sexual de *H. grisea* é de 50 g (Leite-Castro et al., 2016), pois 95% de machos e fêmeas com peso superior a 50 g, possuíram o IG maior que 30% e uma maior produção de gametas, o equivalente à maturidade sexual. Já os indivíduos com menos de 50 g tinham um IG inferior aos indivíduos

maiores, e uma menor proporção de gametas maduros. Portanto, os animais utilizados no presente estudo foram considerados sexualmente maduros.

As gônadas de ambos os sexos consistiam de uma estrutura simples composta por inúmeros túbulos com diferentes graus de ramificação cada um. Os túbulos ramificados estavam unidos a um único gonoducto localizado na parte anterior e dorsal do corpo. Este gonoducto desemboca no gonoporo, orifício de abertura ao meio externo localizado ~2 cm da extremidade anterior. Padrões semelhantes foram encontrados por Santos et al., (2015) em *H. forskali* e por Asha & Muthiah (2008) em *H. spinifera*. Mercier & Hamel (2009) também afirmam que esse é um padrão anatômico comum em Holothroidea. Algumas diferenças na organização dos túbulos gonadais entre machos e fêmeas podem ocorrer, no qual machos podem apresentar mais bifurcações tubulares do que as fêmeas, uma vez que estes necessitam de uma maior produção de gametas (Peters-Didier, 2016). Essas diferenças não estão presentes em todas as espécies de pepino do mar, sendo a estrutura gonadal similar em ambos os sexos (Hamel et al., 1993). No presente estudo, o padrão de ramificação dos túbulos gonadais foi semelhante entre machos e fêmeas, de modo que um túbulo proximal (ligados diretamente ao gonoducto do gonoporo) ramifica-se uma vez em dois túbulos distais. Esses túbulos distais, podem se ramificar em outros dois túbulos mais distais, mas nem todos os tubos apresentam essa segunda ramificação. Não foram observadas diferenças na quantidade e nos tipos de ramificações tubulares entre machos e fêmeas. No presente trabalho as gônadas foram coletadas apenas durante a estação reprodutiva (estágio maduro ou imediatamente após a desova). Portanto, não foi possível verificar se há diferença na ramificação tubular entre diferentes estágios de maturação gonadal desta espécie.

O dimorfismo gonadal foi observado quanto a coloração, pois as fêmeas apresentaram gônadas de cor rosa, variando entre rosa escuro avermelhado (62,5% das fêmeas, Figura 1a) a rosa claro (37,5% das fêmeas, Figura 1b). Os machos apresentaram as gônadas com coloração

creme, variando de creme escuro (82,9% dos machos, Figura 1c) a creme esbranquiçado (17,1% dos machos, Figura 1d). Histologicamente, os ovários rosa escuro apresentavam parede tubular fina e inúmeros ovócitos maduros no lúmen, indicando o estágio maduro da gametogênese (Figura 2a); os ovários com coloração rosa claro continham ovócitos maduros remanescentes e espaços vazios no lúmen, indicando o estágio de pós-desova (Figura 2b); os testículos com coloração creme escuro apresentaram parede tubular fina e lúmen preenchido por espermatozoides livres, indicando o estágio maduro da gametogênese (Figura 2c); e testículos com coloração creme esbranquiçado continham espermatozoides remanescentes e espaços vazios no lúmen, indicando o estágio de pós-desova (Figura 2d).

Outras espécies de pepino do mar como *Holothuria arguinenses* (Domingo-Godines et al., 2015) apresentam a mesma coloração de gônada. Porém espécies como *Cucumaria japonica* e *H. forskali* possuem gônadas respectivamente verdes e laranjas em fêmeas, e amarelas e rosa nos machos (Belova & Viktorovskaya, 2007; Santos et al., 2015). A espécie *Holothuria sanctori* também possui variação de cores ao longo do período reprodutivo, apresentando-se, nas fêmeas, desde o laranja intenso/vermelho no estágio maduro, ao translúcido no estágio pós-desova; e nos machos do branco/bege claro ao branco translúcido, nos estágio maduro e pós-desova, respectivamente (Navarro et al., 2012). Essa variação também pode ser observada em *Holothuria leucospilota* e *Holothuria atra* por Purwati & Luong-Van, (2003) e Abdel-Razek et al., (2005), mostrando assim que o padrão de coloração pode mudar de acordo com o estágio de maturação do animal. Portanto, observações de aspectos macroscópicos como variação de coloração gonadal pode servir como um método descritivo do estágio de desenvolvimento gonadal em diferentes épocas reprodutivas dos pepinos do mar adultos.

No estágio gonadal maduro, o volume das gônadas de *H. grisea* variou de 20-55 mL em fêmeas e 19-45mL em machos. No estágio pós-desova o volume variou de 5-11 mL em fêmeas, e 2,5-10 mL em machos. O peso das gônadas femininas variou de 4,7-81,7 g, com média de

24,2 ± 14,2 g. As gônadas masculinas apresentaram seu peso variando de 2,3-35,6 g com média de 17,9 ± 9,5 g. Essa grande variação no peso e volume das gônadas pode ser explicada pelo estágio gonadal em que as mesmas se encontravam, uma vez que foram avaliadas gônadas no estágio maduro (peso superior a 40 g, e volume superior a 25 mL) e gônadas no estágio pós-desova (peso inferior a 40 g e volume inferior a 6 mL). Em espécies de pepino do mar que possuem periodicidade reprodutiva, como *H. scabra*, o peso e o tamanho (volume) das gônadas tendem a mudar ao longo do período, uma vez que esses fatores dependem do estágio de desenvolvimento das gônadas (Ramofafia et al., 2003).

Normalmente, o diâmetro dos túbulos gonadais de pepino do mar também está relacionado com o estágio de maturação gonadal. Os maiores diâmetros tubulares são encontrados em gônadas maduras, enquanto os menores em estágio pós-desova (Ramofafia et al., 2003). Porém, no presente trabalho, houve pouca variação do diâmetro dos túbulos entre os estágios gonadais, sendo 1,6 ± 0,4 nas fêmeas e 1,3 ± 0,5 nos machos. Essa pouca variação do diâmetro dos túbulos entre os estágios foi ocasionada pelo fato de que todas as coletas foram feitas no ápice da estação de desova. Portanto, as gônadas em estágio pós-desova foram observadas imediatamente após a desova, fazendo com que os túbulos apresentassem uma maior flacidez, mas mantivessem o diâmetro semelhantes aos do estágio maduro. Caso a coleta ocorresse após a estação de desova, os túbulos estariam retraídos e com diâmetros menores, como relatado por Leite-Castro et al., (2016). Além disso, observou-se que as gônadas classificadas como pós-desova continham gametas remanescentes dentro do túbulo, demonstrando que esses animais não desovam completamente.

O diâmetro maior nos túbulos femininos em relação aos masculinos deve-se à necessidade de um espaço maior do lúmen do túbulo para o armazenamento dos ovócitos que, por meio das análises microscópicas, demonstraram ser gametas maiores do que os masculinos. Nestas análises microscópicas, as células gaméticas femininas (ovócitos) apresentaram-se

arredondadas ou levemente ovais, com menor diâmetro variando de 73,6 a 110,7 μm (média $94,4 \pm 8,4 \mu\text{m}$), e maior diâmetro variando de 90,4 a 116,3 μm (média dos diâmetros $104,6 \pm 7,7 \mu\text{m}$). Outras espécies como *H. leucospilota*, *H. sanctori*, *Bohadschia vitiensis* também apresentaram valores semelhantes (Domingo-Godines et al., 2015; Navarro et al., 2012; Omar et al., 2013). Em espécies como *Psolus fabricii*, o diâmetro do ovócito foi maior que 800 μm no estágio maduro (Hamel et al., 1993). Bueno et al., (2015) afirmam que a variação de tamanho e a presença de ovócitos maiores em algumas espécies, podem ser uma estratégia voltada para a sobrevivência das larvas e/ou juvenis. Por exemplo, espécies de zonas temperadas, apresentam a atividade reprodutiva em restrito intervalo de tempo e, na tentativa de assegurar o sucesso da reprodução, há um grande investimento no gameta. Outro fator relacionado com o tamanho do ovócito é a fecundidade, pois vários trabalhos mostraram que ovócitos menores estão relacionados com uma maior fecundidade em invertebrados (Thorson, 1950; Catalan & Yamamoto, 1994). Mercier & Hamel, (2010) também observaram essa relação entre o tamanho do ovócito e a eficiência da fecundidade. Sabe-se que a fecundidade é um critério muito relevante para o sucesso reprodutivo, portanto, o pequeno tamanho dos ovócitos de *H. grisea* observados no presente trabalho revelou uma característica interessante dessa espécie para aumentar o sucesso da fertilização na natureza, bem como para o desenvolvimento da sua reprodução em cativeiro.

Nas análises microscópicas dos gametas masculinos, observou-se espermatozoides com cabeças arredondadas (diâmetro médio de $3,3 \pm 0,41$), com menor diâmetro com média de $3,0 \pm 0,92 \mu\text{m}$ e maior diâmetro de $3,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Na espécie *Psolus fabricii* a cabeça apresentou uma média entre 5 e 6 μm de diâmetro (Hamel et al., 1993), e na espécie *Rhabdomolgus ruber* teve uma média de 11,5 μm (Eckelbarger & Riser, 2013). Apesar de algumas diferenças na morfologia dos espermatozoides de uma espécie para outra, a maioria se assemelha. Segundo Men-ker, (1970) o diâmetro médio da cabeça de espermatozoides maduros é em torno de 3 μm

para a maioria das espécies de holotúrias, portanto *H. grisea* apresenta-se dentro deste padrão. Os Holothurides são considerados plesiomórficos em relação as outras classes de equinodermos, pois seus espermatozoides não apresentam apomorfias certas (Jamieson, 1985). Isso pode se dar pelo fato de haver uma alta conservação das células germinativas dos machos, no qual há uma generalização na transmissão das células primitivas (Franzen, 1956).

A média de pH do sêmen foi de $7 \pm 0,5$ e a osmolaridade de $1260,5 \pm 13,8$ mOsmol kg⁻¹. A concentração espermática foi de $50,6 \pm 17,3 \times 10^6$ espermatozoide mL⁻¹. Há poucos trabalhos sobre caracterização dos gametas de pepinos do mar (Shao et al., 2006; Domingo-Godines et al., 2015), o que dificulta a comparação dos dados com o de outras espécies. A maioria dos trabalhos se detém ao estudo das gônadas e índice gonadal (IG) com ênfase em elucidar a biologia reprodutiva. Porém a caracterização das células gaméticas e de seus meios associados, é imprescindível para o desenvolvimento de técnicas que exigem manipulação dos gametas uma vez que esses podem ser usados na reprodução assistida e em programas de conservação (Álvarez-Guerrero et al., 2014). Salienta-se que o presente trabalho é pioneiro na caracterização dos gametas de *H. grisea* e esses dados servem como subsídios para trabalhos posteriores.

O índice gonadal é uma importante fonte de avaliação, pois uma pesquisa do IG é um método para descrever o ciclo reprodutivo, elucidando em qual período do ano os indivíduos estão ativos sexualmente (Mezali et al., 2014). O índice gonadal seguiu um padrão semelhante entre as fêmeas e os machos tanto no estágio maduro ($49,68 \pm 12,97\%$ e $40,21 \pm 8,58\%$, respectivamente) quanto aos pós desova ($18,74 \pm 5,86\%$ nas fêmeas e $4,73 \pm 7,52\%$ nos machos) ao longo dos três meses. Valores semelhantes, na época reprodutiva (41-42%) para a mesma espécie, foram encontrados por Leite-Castro et al., (2016). Estes mesmo autores observaram que valores inferiores a 10% são encontrados fora da estação reprodutiva. Esses dados corroboram com os resultados Shiehl & Uthicke, (2006), que afirmam que os maiores

valores de IG em pepinos do mar são atingidos, principalmente, na estação reprodutiva. Já Thorne et al. (2012), encontram valores inferiores de IG (1,3-12,9%) para a espécie *H. atra*.

Fatores ambientais tais como precipitação mensal, maré, concentração de clorofila-a, fotoperíodo, estação do ano, fase lunar e temperatura podem interferir em vários parâmetros reprodutivos de pepinos do mar (Navarro et al., 2012; Ramofafia et al., 2000; Drumm & Loneragan, 2005; Battaglione et al., 2002; Leite-Castro et al., 2016). Em várias espécies, o fator temperatura exerce forte influência sobre o desenvolvimento das gônadas (Hopper et al., 1998; Conand et al., 2002; Navarro et al., 2012). Esses fatores podem inicialmente induzir o início da síntese dos gametas. Posteriormente, intensificam a síntese de gametas quando é evidente o aumento da massa gonadal e o diâmetro dos túbulos. E, finalmente, causando a desova/liberação de gametas (Hamel & Mercier, 2004). Para *H. grisea* no Nordeste do Brasil, a precipitação e concentração de clorofila-a foram relatadas como as condições mais influenciadoras da maturação gonadal, sendo, portanto, relevante para a definição do ciclo reprodutivo (Leite-Castro et al., 2016). Durante o presente estudo, a precipitação no local de coleta teve mínima de 149,8 mm e máxima de 382 mm, apresentando média de 285,93 mm, e a concentração de clorofila-a foram $0,61 \pm 0,13$, estando dentro dos padrões previamente descritos como ideais para a época de desova.

Além dos fatores citados acima, observa-se que, durante a época de desova, há um comportamento gregário em muitas espécies de pepino do mar. Tal como foi observado em *Holothuria scabra* e *Cucumaria frondosa* (Hamel & Mercier, 1996b, 1999; Mercier et al., 2000a) que visa aumentar as chances de encontro entre os gametas possibilitando uma maior eficiência na fecundação externa. Esse comportamento também foi observado no presente estudo, porém 29,17% dos animais apresentavam-se isolados. Dos 24 grupos encontrados ao longo do estudo, 41,7% eram grupos com mais de três animais, 17,7% com três animais e 12,5% eram duplas. Apesar das coletas terem sido realizadas no ápice da época de desova, foi

observado ~30% de animais isolados. Essa observação revelou uma diferença entre as espécies citadas acima, que se agrupam mais durante o período de desova. Isso se deve a uma característica estudada por Leite-Castro et al., (2016), que concluíram que a *H. grisea* possui um comportamento de maior agregação quando está havendo o crescimento gonadal (durante a gametogênese), tendo seu menor grau de agregação no pico de maturidade gonadal. Nessa espécie, portanto, a agregação tem mais importância na indução da gametogênese favorecendo a sincronia reprodutiva da população, conforme já observado para outras espécies como *Cucumaria frondosa* (Hamel & Mercier, 1996b, 1999).

Quanto ao comportamento reprodutivo, os animais apresentaram comportamentos típicos que antecedem a desova de pepinos do mar: parte anterior do corpo ereta, para expor o gonoporo na parte anterior dorsal do corpo, e em movimentos serpentinos (Mercier & Hamel, 2009). Ao desovarem, os gametas foram liberados por um único gonoporo. A maioria dos Aspidocirótidos elevam a extremidade anterior do corpo durante a desova para facilitar a dispersão de gametas na coluna d'água e otimizar a fertilização externa (McEuen, 1988). Observou-se que os machos de *H. grisea* desovaram minutos antes das fêmeas. Na maioria das espécies de holoturias, os machos desovam antes das fêmeas pois o sêmen diluído na água funciona como sinal químico para induzir as fêmeas à desovarem (Mercier & Hamel, 2009). Foi observado ainda que ambos os sexos possuíram o mesmo comportamento de desova, mas em alguns poucos casos, as fêmeas tiveram o corpo contorcido e uma protuberância no gonoporo imediatamente antes da desova, mostrando um dimorfismo sexual comportamental temporário.

Conclusões

Conclui-se que os animais não possuem dimorfismo sexual externo, no entanto as gônadas, na estação reprodutiva, são de fácil identificação à dissecação. Além disso, um dimorfismo comportamental pré-desova pode ser observado em fêmeas. Mesmo este sendo um

trabalho pioneiro que trata de aspectos físico-químicos dos gametas e seus meios, conclui-se ainda que apesar de suas particularidades, segue o padrão morfológico e comportamental de diversas espécies de equinodermos. Os dados de caracterização do presente estudo ampliam os conhecimentos sobre a biologia reprodutiva dessa espécie, além disso podem subsidiar pesquisas de aplicabilidade desses conhecimentos em reprodução assistida, visando produção comercial em cativeiro ou em programas de repovoamento.

Agradecimentos

A empresa Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos por todo o apoio financeiro durante a execução do trabalho e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Referências

- ABDEL-RAZEK, F.A.; ABDEL-RAHMAN, S.H.; EL-SHIMY, N.A.; OMAR, H.A. Reproductive biology of the tropical sea cucumber *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Red Sea coast of Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 31, n. 2, p. 383-402, 2005.
- ÁLVAREZ-GUERRERO, A.; MEDRANO, A.; MORENO-MENDOZA, N. Characterization of gametes in two phyllostomid bat species: *Artibeus jamaicensis* and *Sturnira lilium*. **Animal Reproduction Science**. v. 145, p. 170–181, 2014. doi: [dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.015](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.015).
- ASHA, P.S.; MUTHIAH, P. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. **Aquaculture International**. v. 16, n. 3, p. 231–242, 2008. doi: [10.1007/s10499-007-9140-z](https://doi.org/10.1007/s10499-007-9140-z).
- BATTAGLENE, S.C.; SEYMOUR, J.E.; RAMOFAFIA, C.; LANE, I. Spawning induction of three tropical sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. **Aquaculture**. v. 207, p. 29-47, 2002. doi: [doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00725-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00725-6)
- BELOVA, G.V.; VIKTOROVSKAYA, G.I. Morphometric Characteristic of Sex Cells and Seasonal Changes of Female Gonads of *Cucumaria japonica* (Semper, 1868) (Echinodermata: Holothuroidea) from Peter the Great Bay, Sea of Japan. **Russian Journal of Marine Biology**. v. 33, p. 173-180, 2007. doi: [10.1134/S1063074007030054](https://doi.org/10.1134/S1063074007030054).
- BUENO, M.L.; TAVARES, Y.A.T.; DOMENICO, M.D.; BORGES, M. Gametogenesis and weight change of body organs of the sea cucumber *Holothuria (Halodeima) grisea* Aspidochirotida: Holothuriidae) in Southern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**. v. 63, n. 2, p. 285–296, 2015. doi: [dx.doi.org/10.15517/rbt.v63i2.23163](https://doi.org/10.15517/rbt.v63i2.23163).

CATALAN, M.A.B.; YAMAMOTO, M. Annual reproductive cycle of the Japanese holothurian *Eupentacta chironjelmii*. **Canadian Journal of Zoology**. v. 72, n. 2, p. 387–396, 1994. doi: 10.1139/z94-055.

CONAND, C.; UTHICKE, S.; HOAREAU, T. Sexual and asexual reproduction of the holothurian *Stichopus chloronotus* (Echinodermata): A comparison between La Réunion (Indian Ocean) and east Australia (Pacific Ocean). **Invertebrate Reproduction & Development**. v. 41, p. 235-242, 2002. doi:10.1080/07924259.2002.9652756.

DABBAGH, A.R.; SEDAGHAT, M.R. Breeding and rearing of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Iran. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**. v. 32, p. 49-52, 2012.

DOMÍNGUEZ-GODINO, J.A.; SLATER, M.J.; HANNON, C.; GONZÁLEZ-WANGÜERMERT, M. A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. **Aquaculture**. v. 438, p. 122-128, 2015. doi: doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.004.

DRUMM, D.J.; LONERAGAN, N.R. Reproductive biology of *Holothuria leucospilota* in the Cook Islands and the implications of traditional fishing of gonads on the population. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**. v. 39, n. 1, p. 141–156, 2005. doi: dx.doi.org/10.1080/00288330.2005.9517297

ECKELBARGER, K.J.; RISER, N.W. Derived sperm morphology in the interstitial sea cucumber *Rhabdomolgus ruber*, with observations on oogenesis and spawning behavior. **Invertebrate Biology**. v. 132, n. 3, p. 270–281, 2013. doi: 10.1111/ivb.12030.

FABINYI, M. Historical cultural and social perspectives on luxury seafood consumption in China. **Environmental Conservation**. v. 39, p. 83–92, 2012. doi: 10.1017/S0376892911000609.

FRANZEN, A. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. **Zoologiska Bidrag Fran Uppsala**. v. 31, p. 355-482, 1956.

FUJIWARA, A.; YAMANO, K.; OHNO, K.; YOSHIKUNI, M. Spawning induced by cubifrin in the Japanese common sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Fisheries Science**, v. 76, p. 795-801, 2010. doi:10.1007/s12562-010-0262-2

HAMEL, J-F.; HIMMELMAN, J.H.; DUFRESNE, L. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). **Biological Bulletin**. v. 184, n. 2, p. 125–143, 1996. doi:10.2307/1542223

HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Gonad morphology and gametogenesis of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**. v. 8, p. 22-33, 1996b.

HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Mucus as a mediator of gametogenic synchrony in the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea: Echinodermata). **Journal of the Marine Biological Association UK**. 79(1):121-129, 1999. doi:10.1017/S0025315498000137.

HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Synchronomous gamete maturation and reliable spawning induction method in holothurians. In “Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management” (A. Lovatelli, C. Conand, S. Purcell, S. Uthicke, J.-F. Hamel and A. Mercier, eds.), **FAO Fisheries Technical Paper**. v. 463, p.359-371, 2004.

HOOOPER, D.L.; HUNTER, C.R.; RICHMOND, R.H. Sexual reproduction of the tropical sea cucumber, *Actinopyga mauritiana* (Echinodermata: Holothuroidea), in Guam. [Bulletin of Marine Science](#). v. 63, n. 1, p. 1-9, 1998.

JAMIESON, B.G.M. The spermatozoa of the Holothuroidea (Echinodermata): an ultrastructural review with data on two Australian species and phylogenetic discussion. **Zoologica Scripta**. v. 14, n. 2, p. 123–135, 1985. doi: 10.1111/j.1463-6409.1985.tb00183.x.

LEITE-CASTRO, L.V.; JUNIOR, J.S.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; NUNES, J.F.; HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria grisea* in Brazil: importance of social and environmental factors in breeding coordination. **Marine Biology**. v. 67, p. 1-13, 2016. doi:10.1007/s00227-016-2842-x.

MCEUEN, F. Spawning behaviors of northeast Pacific sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata). **Marine Biology**. v. 98, p. 565–585, 1988. [doi: dx.doi.org/10.1007/BF00391548](https://doi.org/10.1007/BF00391548).

MENKER, D. Lebenszyklus, Jugendentwicklung und Geschlechtorgane von *Rhabdomolgus ruber* (Holothuroidea:Apoda). **Marine Biology**. v. 6, n. 2, p. 167–186, 1970. doi: 167. doi:10.1007/BF00347247.

MERCIER, A.; BATTAGLENE, S.C.; HAMEL, J-F. Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Solomon Islands. **Hydrobiologia**. v. 440, p. 81-100, 2000a. doi:10.1023/A:1004121818691.

MERCIER, A.; HAMEL, J-F. Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. **Advances in Marine Biology**. v. 55, p. 1–302, 2009. doi: 10.1016/S0065-2881(09)55001-8.

MERCIER, A.; HAMEL, J-F. Synchronized breeding events in sympatric marine invertebrates: role of behavior and fine temporal windows in maintaining reproductive isolation. **Behavioral Ecology and Sociobiology**. v. 64, p. 1749-1765, 2010. doi:10.1007/s00265-010-0987-z

MENDES, F.M.; MARENZI, A.W.C.; DOMENICO, M.D. Population patterns and seasonal observations on density and distribution of *Holothuria grisea* (Holothuroidea: Aspidochirotida) on the Santa Catarina Coast, Brazil. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**. v. 23, p. 5-10, 2006.

MEZALI, K.; SOUALILI, D.L.; NEGHLI, L.; CONAND, C. Reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Holothuroidea:Echinodermata) in the southwestern Mediterranean Sea: interpopulation variability. **Invertebrate Reproduction & Development**. v. 58, n. 3, p. 179-189, 2014. doi: 10.1080/07924259.2014.883337.

MOURA, R.M.; ARAGÃO, K.; MELO, A.A.; CARNEIRO, R.F.; OSÓRIO, C.B.H.; LUZ, P.B.; QUEIROZ, A.F.S.; SANTOS, E.A.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S. *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects.

Fundamental & Clinical Pharmacology. v. 27, n. 6, p. 656–668, 2013. doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01073.x.

NAVARRO, P.G.; GARCÍA-SANZ, S.; TUYA, F. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). **Scientia Marina.** v. 76, n. 4, p. 741-752, 2012 doi: 10.3989/scimar.03543.15B

OMAR, H.A.; ABDEL, R.F.A.; ABDEL, R.S.H.; EL, S.N.A. Reproductive periodicity of sea cucumber *Bohadschia vitiensis* (Echinodermata: Holothuroidea) in Hurghada area, Red Sea, Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research.** v. 39, p. 115–123, 2013. doi:10.1016/j.ejar.2013.06.002.

PURCELL, S.; MERCIER, A.; CONAND, C.; HAMEL, J-F.; TORAL-GRANDA, M.V.; LOVATELLI, A.; UTHICKE, S. Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. **Fish and Fisheries.** v. 14, p. 34–59, 2013. doi: 10.1111/j.1467-2979.2011.00443.x.

PURWATI, P.; LUONG-VAN, J.T. Sexual reproduction in a fissiparous holothurian species, *Holothuria leucospilota* Clark 1920 (Echinodermata: Holothuroidea). **SPC Beche-de-mer Information Bulletin.** v. 18, p. 33–38, 2002.

PETERS-DIDIER, J.; PARDO, L.M.; GARRIDO, O.; GALLARDO, C.S. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida) in southern Chile. **Journal of the Marine Biological Association UK . p. 1-13, 2016.** doi:10.1017/S0025315416001193.

RAMOFAFIA, C.; BATTAGLENE, S.C.; BELL, J.D.; BYRNE, M. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. **Marine Biology.** v. 136, p. 1045-1056, 2000. doi:10.1007/s002270000310.

RAMOFAFIA, C.; BYRNE, M.; BATTAGLENE, C.S. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. **Marine Biology.** v. 142, p. 281–288, 2003. doi:10.1007/s00227-002-0947-x.

SANTOS, R.; DIAS, S.; PINTEUS, S.; SILVA, J.; ALVES, C.; TECELÃO, C.; PEDROSA, R.; POMBO, A. Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. **Aquaculture Research.** v. 47, n. 7, p. 2307–2323, 2015. doi:10.1111/are.12683

SHAO, M.Y.; ZHANG, Z.F.; YU, L.; HU, J.J.; KANG, K.H. Cryopreservation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) sperm. **Aquaculture Research.** v. 37, n. 14, p. 1450-1457, 2006. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01581.x.

SHIELL, G.; UTHICKE, S. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria whitmaei* (Holothuroidea: Aspidochirotida) in the Indian and Pacific Ocean regions of Australia. **Marine Biology.** v. 148, p. 973–986, 2006. doi: 10.1007/s00227-005-0113-3.

THORSON, G. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. **Biological Reviews.** v. 25, p. 1–45, 1950. doi: 10.1111/j.1469-185X.1950.tb00585.x.

TO, A.W.; SHEA, S.K. Patterns and dynamics of bêche-de-mer trade in Hong Kong and mainland China: implications for monitoring and management. **Traffic Bulletin**. v. 24, n. 2, p. 65–76, 2012

TOMMASI, L.R. Lista dos holothuroidea recentes do Brasil. **Contr Inst Oceanogr Univ São Paulo Ser Oceanogr Biol**. v. 15, p. 15–129, 1969.

THORNE, B.V.; ERIKSSON, H.; BYRNE, M. Long term trends in population dynamics and reproduction in *Holothuria atra* (Aspidochirotida) in the southern Great Barrier Reef; the importance of asexual and sexual reproduction. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. v. 93, n. 4, p. 1067–1072, 2012. doi: <https://doi.org/10.1017/S0025315412000343>

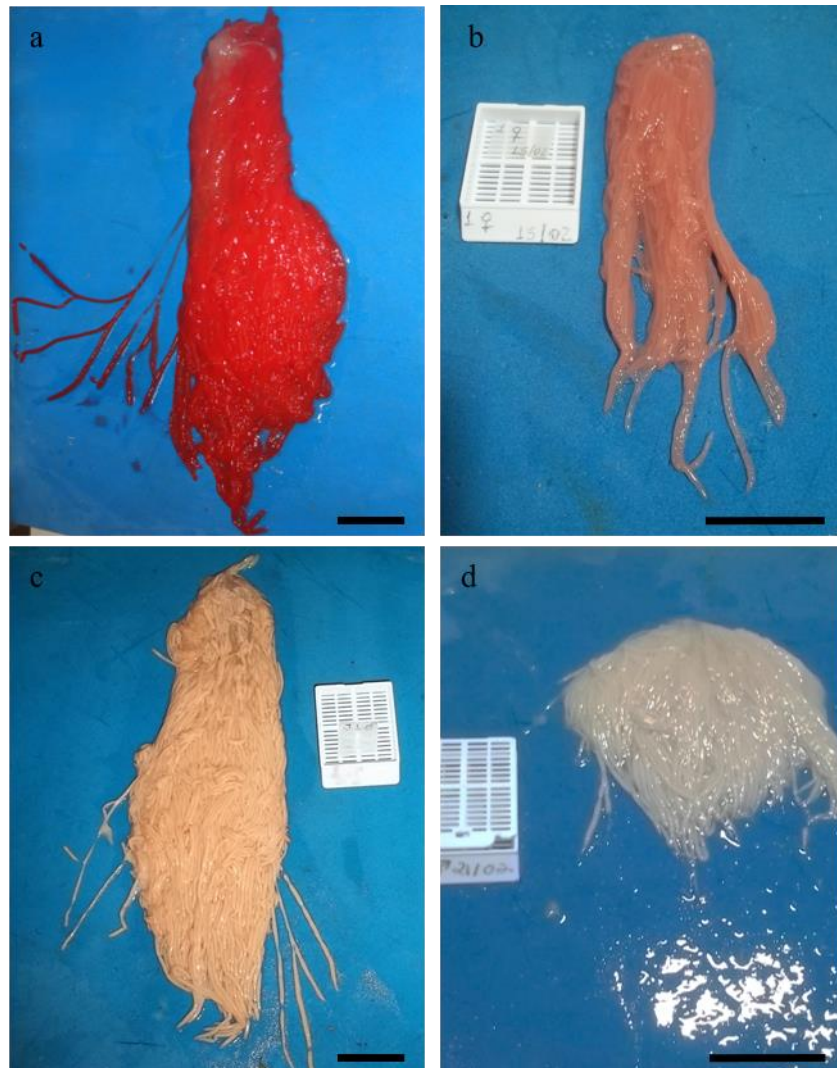


Figura 1. Gônadas de *H. grisea* após dissecação destacando dimorfismo quanto a coloração; (a) ovário rosa avermelhado; (b) ovário cor de rosa claro; (c) testículo creme escuro; (d) testículo creme esbranquiçado. Barras de escala pretas representam 3 cm.

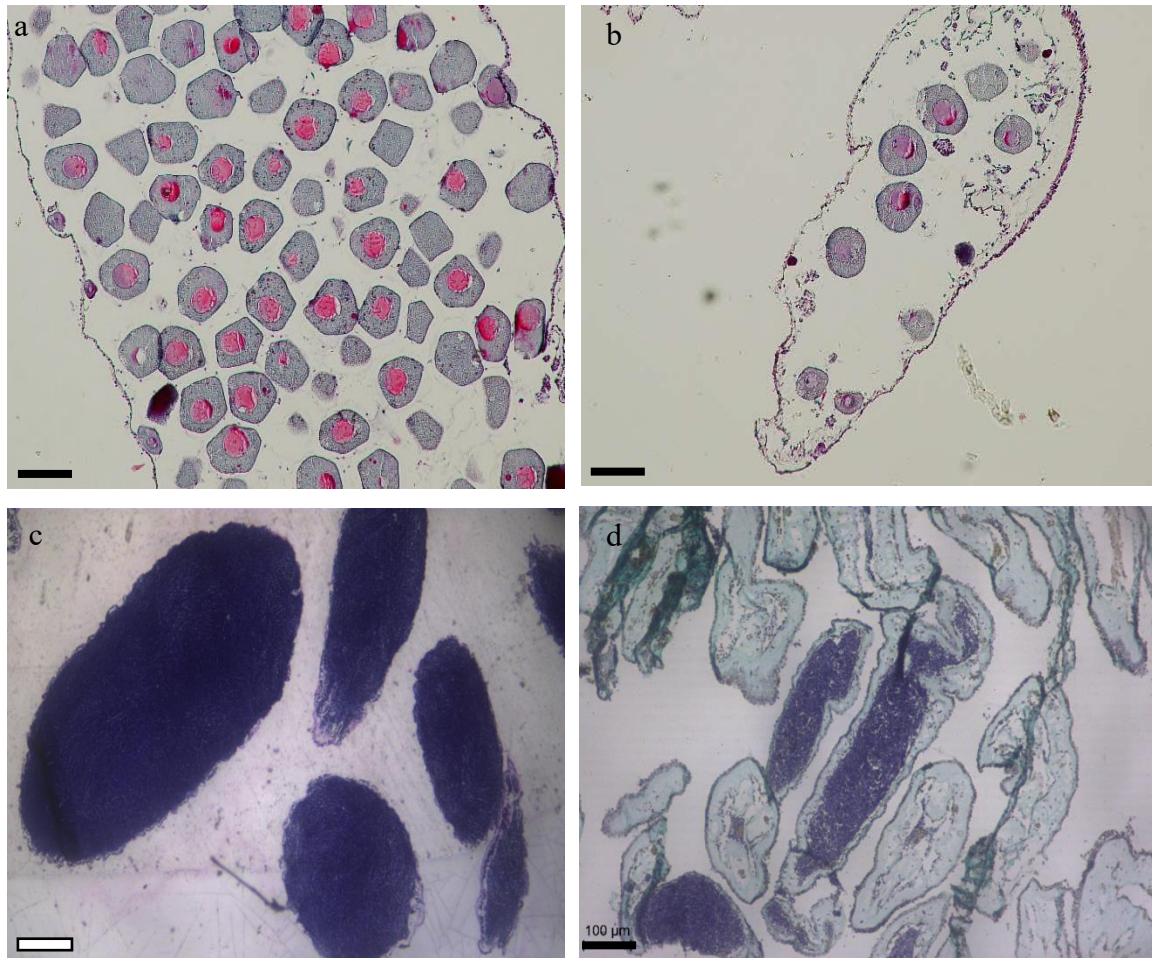


Figura 2. Estágios da gametogênese das gônadas de *H. grisea* em imagens de cortes histológicos; (a) ovário maduro; (b) ovário pós-desova; (c) testículo maduro; (d) testículo pós-desova. Barras de escala pretas representam 100 μm, e barra branca representa 200 μm.

7 CAPÍTULO 2

*Characterization and development of microsatellite markers for the sea cucumber *Holothuria grisea* (Selenka 1867), using next generation sequencing.*

Periódico: Journal of Heredity (Submetido em 13 de junho de 2017)
Qualis: A2

**Characterization and development of microsatellite markers for the sea cucumber
Holothuria grisea (Selenka 1867), using next generation sequencing.**

VANESSA ALVES PEREIRA¹, JAMILLE MARTINS FORTE², JOSÉ PEDRO VIEIRA
ARRUDA JÚNIOR³, RODRIGO MAGGIONI², CARMINDA SANDRA BRITO SALMITO
VANDERLEY¹

^{1,4}Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Pós-graduação em ciências
veterinárias, Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi - Fortaleza/CE- Brazil CEP: 60.714-903

Fone: +55 (85) 3101.9859 - Fax (85) 3101.986

²Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Marinhas Tropicais, Av. da Abolição, 3207- Meireles – Fortaleza/CE- Brazil

CEP: 60.165-081 Fone: +55 (85) 3366.7000

³Universidade Federal do Ceará, Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências, Avenida
Mister Hull, s/n – Pici - Fortaleza/CE- Brazil CEP: 60455-760 Fone: +55 (85) 3366.9799 Fax

(85) 3366.9784

⁴Correspondence to: vanessabio35@gmail.com

Running title: Genetic diversity of *Holothuria grisea*

ABSTRACT

The sea cucumber *Holothuria grisea* has suffered from an intense demand to supply the Asian market. Thus, many studies many studies have focused on the reproduction and variability of *H. grisea* populations. Here we aimed to identify, characterize, and develop microsatellite markers of next-generation sequencing and to explore an association between these markers and determination of sex in *H. grisea*. To obtain microsatellites, a new generation of sequencing was performed with low coverage and readings were submitted to the SSR_pipeline computational package. Primers were designed for 15 microsatellites selected from a population study of *H. grisea*. The number of alleles ranged from 3 to 14 and observed and expected heterozygotes ranged from 0.156 to 0.906 and from 0.283 to 0.774, respectively. We identified just one locus in Hardy-Weinberg disequilibrium, as well as the presence of null alleles. No evidence of binding disequilibrium was found between the pairs of loci. Only the locus Hgr15607 showed an allele difference between males and females. These data will be useful for *H. grisea* conservation efforts and managing fisheries. Genetic differences suggest that the Hgr15607 locus might be linked to sex determination in these animals.

Keywords: Genetic differentiation, population control, population genetics, sexual dimorphism.

INTRODUCTION

Sea cucumbers are marine invertebrates that belong to phylum Echinodermata, class Holothuroidea. Sea cucumbers do not have sexual dimorphism, they are dioecious and have external fertilization. They feed on debris and organic material from the sediment, participating in recycling in the marine environment, promoting bioturbation, and assisting in the non-equilibrium pH of water, important processes for a survival of coral and other benthic species (Conand 2006).

Sea cucumbers are widely consumed in the Asian market, mainly in China and Japan, being used in cooking and traditional medicine (Uthicke and Conand 2005). In recent years, the increasing demand for sea cucumber has led to an increase in the international price of the product and, consequently, an increase in predatory fishing and a decrease in the natural stocks of the most commercialized species (Robinson and Lovatelli 2015).

In Brazil, the most abundant species of sea cucumber is *Holothuria grisea* Selenka 1867, found from southern Santa Catarina state to the Northeast region (Tommasi 1969; Mendes et al. 2006).

Due to the growing demand for sea cucumber in Asian markets, *H. grisea* has become an

alternative commercial species in Brazil, becoming a source of additional income for fishermen in certain coastal villages (Leite-Castro et al. 2016). However, the lack of specific management protocols for sea cucumber has allowed the intense and disorderly exploitation of the wild populations of *H. grisea* throughout its range in the Brazilian territory (José de Souza Junior, personal observation). Correct management of the fishery is even more important because this species also shows biotechnological potential as a source of bioactive molecules for the pharmaceutical industry (Mourão 2004; Sun et al. 2008; Moura et al. 2013; Melo et al. 2014). The species *H. grisea* is a typical holothurian, which has a cylindrical body, tube feet that help in the fixation, and a mouth surrounded by tentacles (Dias 2012). These characteristics are common to both sexes (the animals do not present sexual dimorphism). Also, *H. grisea* are dioecious animals, without evidence of asexual reproduction (Leite-Castro et al. 2016). The sexes can be identified by the staining of the gonads. Thus, dissection is necessary for a sexual identification.

Studies on captive breeding of *H. grisea* have already been developed by Leite-Castro et al. (2016) and by Bueno et al. (2015). However, little is known about the genetic variability and the population structure of these organisms in the Brazilian coast. In cultivated aquatic species, the inadequate management of the breeding stock can cause a decrease in the genetic diversity of the stocks, affecting characteristics such as disease resistance and growth rate (Liao et al. 2011).

Microsatellite markers are useful in the area of genetic characterization of fish stocks (Chistiakov et al. 2006). Microsatellites were also evaluated for aquaculture variability studies (Chistiakov et al. 2006). These markers, also known as single sequence repeats (SSRs), consist of 2 to 6 base pair repeats, are highly polymorphic and widely distributed in the eukaryotic genome (Beckmann and Weber 1992, Zane et al. 2002). Microsatellite loci, in general, are coding and multi-allelic, being easily and consistently detected by the Polymerase Chain

Reaction (PCR) technique (Schlotterer 1998). Microsatellites have already been developed for several species of sea cucumber, such as *Aspoticophus japonicus* (Zhan et al., 2007) and *Holothuria leucospilota* (Shangguan et al. 2015). Currently, the strategies of identification and characterization of microsatellite loci have evolved to the use of next-generation sequencing (NGS), which allows the rapid and efficient production of large quantities of sequences (Morozova and Marra 2008; Mardis 2008; Yang et al. 2012).

The objective of this work was to identify, characterize, and develop microsatellite markers from new generation sequencing with low coverage, as well as to explore an association between these markers and sex determination in the sea cucumber species *H. grisea*. This is the first time that this type of marker has been proposed for *H. grisea*, a species of growing commercial and environmental interest on the South American coast.

MATERIAL AND METHODS

COLLECTION OF ANIMALS AND DNA EXTRACTION

The research was authorized by the System of Authorization and Information on Biodiversity (SISBIO) of the Ministry of the Environment - 22742-1. For the development of the microsatellites, 32 adult *H. grisea* with total weight above 90 g were collected in Bitupitá beach (Barroquinha, Ceará, Brazil) (02 ° 47'43.38 "S, 041 ° 14'33.02"W), in November 2015. The animals were anesthetized and dissected for inspection of the gonads and identification of the sex. Genomic DNA samples were isolated from muscle tissue preserved in 95% alcohol with the Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega). The DNA samples were quantified in Nanodrop® microvolumetric spectrophotometer and maintained at -20°C until processing.

PREPARATION OF THE GENOMIC LIBRARY AND NEXT GENERATION SEQUENCE

Samples from one male and one female were selected for next generation sequencing. DNA from two samples was re-extracted with the Wizard® SV Genomic DNA Purification System

(Promega) and quantitated using a QUBIT 2.0 fluorometer (Life Technologies). These samples were then submitted separately to the preparation of genomic libraries with the Nextera DNA Library Prep Kit (Illumina) according to the manufacturer's recommendations. Soon after, the samples were submitted to the sequencing of tip pairs in the Illumina MiSeq® System FastQC (Version 3, June 29, 2007). The readings obtained were initially evaluated for quality with the FastQC program. The data files were analyzed and converted to the FASTA format by the PRINSEQ program (Schmieder and Edwards 2011).

IDENTIFICATION OF MICROSATELLITES

The pre-processed and converted files were re-filtered in the PRINSEQ program (Schmieder and Edwards 2011), following these parameters: 100–600 bp, 40–60% GC content and no poly-A/poly-T or Poly-N. For the identification of the microsatellites, the SSR_pipeline (Miller et al. 2013) was used, using as parameters the identification of tri, tetra, penta, and hexanucleotides in repetitions of six, five and four times, respectively. The microsatellites were filtered, and only those with a flanking region of at least 40 bp were selected. For better visualization of SSR, the WEBSAT program (Martins et al. 2009) was used for the elimination of imperfect microsatellites.

The BatchPrimer3 software (Frank et al., 2008) was used to design the primers, following these criteria: amplification products of 100–500 bp, melting temperature ranging from 50–60°C, GC content between 40–60% and at least one C/G in the last five bases in the 3' portion of the primer (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') corresponding to 18 bp of the first universal M13 (-21), thus allowing genotyping from polyvalent primers (Schuelke 2000; Diniz et al. 2004).

TEST OF PRIMERS AND GENOTYPE

To test the primers, a DNA extraction was performed in which approximately 3 g of tissue was processed using the Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega) according to

the manufacturer's instructions. The genomic material was quantified in a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Of the 50 selected loci, 15 primer pairs for microsatellite amplification were designed and tested. Reactions were performed in a total volume of 10 μ l containing 20 μ g of genomic DNA, 1 \times buffer, 2 mM MgCl₂, 250 μ M of each dNTP, 1 μ M of each primer, and 0.25 U of *Taq* DNA polymerase. Amplification was performed at 94°C for 4 min followed by 25 cycles with denaturation at 94°C for 30 s, 50–60°C for 90 s, prolongation at 72°C for 60 s and final extension 72°C for 45 s. Eight loci were selected and followed for insertion of the fluorescent tail (Table 1). The reaction composition was made with the addition of 0.06 μ M fluorescent tail M13 (-21) (PET, 6-FAM, HEX or NED). For the production of labeled amplicons, the same amplification conditions described above were used, with the addition of eight cycles of 94°C for 30 s, 53°C for 45 s, and 72°C for 45 s (for addition of the fluorescent tail), as well as an increase of the final extension to 60 min at 72°C in order to standardize the addition of the A terminal observed in PCR conducted with *Taq* DNA polymerase. The amplified products were followed by a capillary electrophoresis genotyping process in an ABI3500 automated sequencer (Applied Biosystems, CA, USA). An identification of products and services was performed by the GeneMapper Version 4.0 program (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

DATA ANALYSIS

The software GENEPOP v. 4.2 (Raymond and Rousset 1995) and GenAlex v. 6.5 (Peakall and Smouse 2006) were used to calculate allele frequencies. The expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosity; number of alleles (N_a) and number of effective alleles (N_e); Hardy-Weinberg equilibrium; connection imbalance; and Wright's indexes (Cockerham and Weir 1993) were calculated. Differentiation between allelic and genotype frequency distributions of males and females was assessed by the Fisher's exact odds test, included in the GENEPOP v. 4.2 (Raymond and Rousset 1995). The presence of null alleles was verified through Microchecker

v. 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). The significance criteria of the multiple tests were corrected following the Bonferroni correction (Rice 1989).

RESULTS

SEQUENCE OF NEXT GENERATION AND IDENTIFICATION OF SSR

A total of 764,601 and 920,260 readings are obtained for BT28M (male) and BT30F (female) samples, respectively, with a mean size of 301 bp. The GC content was 38% for BT28M and 39% for BT30F. From the SSR identification pipeline, a BT28M sample produced a total of 143,588 sequences containing repeats in the chain, while a BT30F product produced 182,326 sequences. The number of sequences containing repeats, tetra, penta, and hexanucleotides in each of the two samples, according to the search parameters, is presented in Table 2.

MALE AND FEMALE GENETIC CHARACTERIZATION

A total of 54 different alleles were found for eight loci in the population. The lowest number of alleles ($n = 3$) was found at locus Hgr15269 and most alleles ($n = 14$) at locus Hgr10123 (Fig. 1). The presence of null alleles was found only for the locus Hgr15607 ($P < 0.05$). The eight loci analyzed showed a similar frequency distribution between males and females ($P > 0.05$). However, in the Hgr15607 locus, a significant difference was observed between the allelic frequencies of males and females ($P < 0.05$). In this locus, alleles with a frequency greater than 0.1 were observed exclusively in females (allele 303) or in males (alleles 291 and 295) (Fig. 1). The genotypic frequencies recorded for males and females did not show significant differences for the locus HGR15607, as well as for any of the other loci studied.

The genetic diversity estimators of the total population are shown in Table 3. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.156 at the Hgr15607 locus to 0.906 at the Hgr10123 locus and heterozygosity (H_e) was expected from 0.283 (Hgr6685) to 0.878 (Hgr10123) (mean of 0.619). After Bonferroni correction, only the Hgr15607 locus showed significantly different proportions than those expected for the Hardy-Weinberg equilibrium, for an alpha of 0.05

(Table 3). Similarly, in the Hgr15607 locus, there is an indication for the presence of null alleles. For the endogamy index (FIS) the mean value found for the population was 0.063. However, this value is strongly influenced by the imbalance observed in Hgr1607. No evidence was found for linkage disequilibrium among the eight loci studied after the Bonferroni correction on the results of 28 multiple test combinations.

DISCUSSION

Several species of sea cucumber have been studied by microsatellite loci (Nelson et al. 2002; Zhan et al. 2007; Liao et al. 2011; Fitch et al. 2012). In species well distributed on large geographic scales, such as *Aspotechopus japonicus*, it is observed that microsatellite markers are highly polymorphic, but genetic differences between wild populations can be reduced (Chen et al., 2008). On the other hand, color variations in this same species showed a significant correlation with genetic differentiation and geographic and reproductive isolation (Kanno and Kijima 2003; Kanno et al. 2006; Kang et al. 2011). The genetic variability observed in the present study for *H. grisea* is comparable to that of cucumbers with similar ecological characteristics (Nelson et al. 2002; Liao et al. 2011; Fitch et al. 2012).

In the present study, only one locus showed an indication of the presence of null alleles, as well as a departure from the proportions expected by the Hardy-Weinberg equilibrium. This separation can be accounted for by several factors, such as selection, inbreeding, Wahlund effect, selective cross-breeding, and by the presence of null alleles (Bohonak 1999; Romana-Eguia et al. 2005; Kordicheva et al. 2010). With the removal of these factors, it is expected that most of the autosomal loci, in natural populations of dioic and diploid organisms, will be in Hardy-Weinberg equilibrium. Specifically for sea cucumbers, it was observed that populations in captivity present more imbalance than wild populations, for the same set of markers (Chen et al. 2008). It was also observed that the dramatic decline in sea cucumber breeding populations causes genetic bottlenecks that also lead to imbalance (Liao et al. 2011).

The population of *H. grisea* studied here does not present evidence of a significant imbalance in seven of the eight loci described.

As observed for most invertebrates, a presence of null alleles in microsatellite loci is common in sea cucumbers. For example, for *A. japonicus* it was observed that seven of 11 microsatellite loci had null alleles (Chen et al. 2008). Common causes for the presence of null alleles are a mutation in the annealing sequences of the primers (Dakin and Avise 2004) and a differential amplification of the alleles, especially those with very different sizes (Wattier et al. 1998). Another source of null alleles involves sex-linked inheritance, where, in diploid organisms, heterogeneous sex carries only one allele if the marker is located on a sex chromosome (Dakin and Avise 2004). In *H. grisea* the locus Hgr15607 presented evidence of the presence of null alleles. However, this result might have been influenced by the significant differences between the allelic frequencies of males and females. Neither sex has shown evidence of homozygosity for this marker, so it is unlikely that Hgr15607 is located on a sex chromosome. Evidence for the existence of sex chromosomes in certain species has already been found for Echinoidea and Asteroidea, but not for Holothuroidea (Kondo and Akasaka 2012). However, the possibility remains that the Hgr15607 marker is bound to the sex determination in *H. grisea*.

The estimated genetic variability for *H. grisea* have values compatible with those found in natural populations of sea cucumbers. The H_e values for natural populations of sea cucumber studied by microsatellite range for 0.574 to 0.768 (Nelson et al. 2002; Kanno et al. 2006; Fitch et al. 2012). Similarly, the mean number of effective alleles observed in the present study was lower than in some previous studies (Chen et al. 2008; Kanno et al. 2006). For microsatellite loci, it is common to observe an effective number of alleles significantly less than the total number since in many cases the allelic frequency of certain variants is much smaller than those of the most frequent alleles. In addition, in relation to the total number of alleles, it has been

observed that the dinucleotide microsatellites, in general, are more variable than the systems with greater repetition.

In conclusion, here we present (for the first time) a set of highly polymorphic markers for the population study of *H. grisea*, a species of growing commercial interest in the Southwest Atlantic. These markers will be useful for informing conservation and fishing strategies, as well as guiding and monitoring the production of these captive animals. Genetic differences suggest that a marker, the locus Hgr15607, might be linked to sex determination in these animals.

FUNDING

Cearense Foundation for Support to Scientific and Technological Development (Funcap) - Strategic Areas AE1-0052-000450100/11.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the company Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos for the financial support during the samples collection and to the Diagnostic Center for Diseases of Aquatic Organisms (CEDECAM) for the support during the execution of all the work.

REFERENCES

- Beckmann JS, Weber JL. 1992. Survey of human and rat microsatellite. *Genomics* 12: 627–631.
- Bohonak AJ. 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *Q Rev Biol* 74(1):21-45.
- Bueno ML, Tavares YAT, Domenico MD, Borges M. 2015. Gametogenesis and weight change of body organs of the sea cucumber *Holothuria (Halodeima) grisea* Aspidochirotida: Holothuriidae) in Southern Brazil. *Rev Biol Trop* 63: 285–296.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255:1-29.
- Conand, C. 2006. Sea cucumber biology: taxonomy; distribution; biology; conservation status. p. 33–50 In: A.W. Bruckner (Ed). *Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae*, 244p. *NOAA Tech Memo*.

- Chen L, Li Q. 2007 Identification and characterization of microsatellite markers derived from expressed sequence tags of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. Mol. Ecol. Notes 7: 1057–1059.
- Chen L, Li Q, Yang J. 2008. Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) from northern China. Aquacult Res 39:1541-1549.
- Cockerham C, Weir B. 1993. Estimation of gene flow from F-statistics. Evolution 47(3): 855-863.
- Dai G, Li ZB, Shangguan JB, Ning YF, Deng HW, Yuan Y, Huang YS, Yang H, Lu J. 2015. Development and characterization of polymorphic microsatellite loci in the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. Genet. Mol. Res 14(1): 538-541.
- Dakin EE, Avise JC. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. Nature Publishing Group 93: 504-509.
- Dias IF. 2012. Distribuição espaço temporal e densidade populacional de *Holothuria (Halodeima) grisea* (Holothuroidea: ASPIDOCHIRODITA) na praia de Bitupitá, Ceará, Nordeste do Brasil. 71 f. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Diniz FM, Maclean N, Paterson IG and Bentzen P. 2004. Polymorphic tetranucleotide microsatellite markers in the Caribbeanspiny lobster, *Panulirus argus*. Mol Ecol Notes 4: 327-329.
- Fitch, AJ, Leeworthy G, Li X, Bowman W, Turner L, Gardner MJ. 2012. Isolation and characterisation of eighteen microsatellite markers from the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata : Holothuriidae). Aust J Zool 60: 368–371. doi: <http://dx.doi.org/10.1071/ZO12114>
- Frank MY, Naxin H, Yong QG, Ming-Cheng L, Yaqin M, Dave H, Gerard RL, Jan D, Olin DA. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. BMC Bioinformatics 9: 253. doi:10.1186/1471-2105-9-253
- Kang JH, Kim YK, Kim MJ, Park JY, An CM, Kim BS, Jun JC, Kim SK. 2011. Genetic Differentiation among Populations and Color Variants of Sea Cucumbers (*Stichopus Japonicus*) from Korea and China. Int. J. Biol. Sci. 7(3): 323-332.
- Kanno M, Kijima A. 2003. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. Fish Sci 69: 806–812
- Kanno M, Li Q, Kijima A. 2005. Isolation and Characterization of Twenty Microsatellite Loci in Japanese Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). Mar. Biotechnol. 7: 179-183. doi: 10.1007/s10126-004-0006-3.
- Kanno M, Suyama Y, Li Q, Kijima A. 2006. Microsatellite Analysis of Japanese Sea Cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, Supports Reproductive Isolation in Color Variants. Mar. Biotechnol. 8: 672–685

- Kondo M, Akasaka K. 2012. Current Status of Echinoderm Genome Analysis - What do we Know? *Curr. Genomics* 13(2): 134–143. doi: <http://doi.org/10.2174/138920212799860643>
- Kordicheva SY, Rubtsova GA, Shitova MA, Shaikhaev GO, Afanasiev KI, Zhivotovsky LA. 2010. A search for null alleles at the microsatellite locus of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Russ J Genet.* 46(8): 1019–1022.
- Leite-Castro LV, Junior JS, Salmito-Vanderley CSB, Nunes JF, Hamel JF, Mercier A. 2016. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria grisea* in Brazil: importance of social and environmental factors in breeding coordination. *Mar Biol* 67: 1-13.
- Liao M, Wang Y, Rong X, Zhang Z, Li B, Wang L, Chen G. 2011. Development of New Microsatellite DNA Markers from *Apostichopus japonicus* and Their Cross-Species Application in *Parastichopus parvimensis* and *Pathallus mollis*. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 5862-5870. doi:10.3390/ijms12095862
- Mardis ER. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 387–402
- Martins WS, Lucas DCS, Neves KFS, Bertioli DJ. 2009. WebSat A Web Software for MicroSatellite Marker Development, *Bioinformatics* 3(6): 282-283.
- Melo AA, Carneiro FR, Silva WM, Moura RM, Silva GC, Sousa OV, Saboya JPS, Nascimento KS, Saker-Sampaio S, Nagano CS, Cavada BS, Sampaio AH. 2014. HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. *Int. J. Biol. Macromolec* 64: 435– 442.
- Mendes FM, Marenzi AWC, Domenico MD. 2006. Population patterns and seasonal observations on density and distribution of *Holothuria grisea* (Holothuroidea: Aspidochirotida) on the Santa Catarina Coast, Brazil. *SPC Beche-de-mer Inf Bull* 23: 5-10.
- Miller MP, Knaus BJ, Mullins TD, Haig SM. 2013. *SSR_pipeline*—Computer software for the identification of microsatellite sequences from paired-end Illumina High-Throughput DNA sequence data (ver. 1.1, February 2014): U.S. Geological Survey 778.
- Morozova O, Marra MA. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92: 255-264.
- Moura RM, Aragão K, Melo AA, Carneiro RF, Osório CBH, Luz PB, Queiroz AFS, Santos EA, Alencar NMN, Cavada BS. 2013. *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. *Fundam Clin Pharmacol* 27: 656–668.
- Mourão PAS. 2004. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. *Curr. Pharm. Des* 10: 967-981.
- Nelson J, Cooper G, Garner T, Schnupf P. 2002. Polymorphic markers for the sea cucumber *Parastichopus californicus*. *Mol Ecol Notes* 2: 233-235

- Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity* 86: 248-249
- Rice W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:(1): 223-225.
- Robinson G, Lovatelli A. 2015. Global sea cucumber fisheries and aquaculture FAO's inputs over the past few years. *FAO Aquaculture Newsletter* 53: 55-57.
- Romana-Eguia MRR, Ikeda M, Basiao ZU, Taniguchi N. 2005. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. *Aquacult. Res* 36(1): 69–78.
- Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27:863-864.
- Scholotterer C. 1998. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? *Dispatch* 8: 132-134L.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nat. Biotechnol* 18: 1–2.
- Shangguan JB, Li ZB, Ning YF, Huang YS, Yuan Y, Lu J, Li BB, Mao XQ. 2015. Screening and characterization of novel polymorphic microsatellite markers from sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Genet. Mol. Res.* 14: 6555-6560. doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.June.12.9>
- Sun GQ, Li L, Yi YH, Yuana WH, Liua BS, Wenga YY, Zhanga SL, Suna P, Wang ZL. 2008. Two New Cytotoxic Nonsulfated Pentasaccharide Holostane (1/420-Hydroxylanostan-18-oic Acid g-Lactone) Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria grisea*. *Helv. Chim. Acta* 91: 1453-1460.
- Tommasi LR. 1969. Lista dos holothuroidea recentes do Brasil. Contribuições Avulsas do Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo, **série Oceanografia Biológica**, São Paulo 15: 1-29.
- Uthicke S, Conand C. 2005. Local examples of beche-de-mer overfishing an initial summary and request for information. *SPC Beche-de-mer Inf Bull* 21: 9-14.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley PF. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535-538.
- Wattier R, Engel CR, Saumitou-Laprade P, Valero M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Mol Ecol* 7: 1569–1573.

Yang T, Bao SY, Ford R, Jia TJ, Guan JP, He YH, Sun XL, Jiang JY, Hao JJ, Zhang XY, Zong XX. 2012. High-throughput novel microsatellite marker of faba bean via next generation sequencing. *BMC Genomics* 13: 1-11.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*. 11(1):1-16.

Zhan A, Bao Z, Lu W, Hu X, Peng W, Wang M, Hu J. 2007. Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Mol Ecol Notes* 7: 1345–1348. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01876.x

Table 1. Characteristics of designed primers.

Locus name	Primer sequence 5'→3'	Repeats	Size (pb)	Marking	Ta
Hgr6916	F: *TTTAGTATGGGGTGATAATTGATTTG R: TGGACAAAAGTGACGTGAGC	(ATGGT) ₅	♀ 158-178 ♂ 163-178	6-FAM	50°C
Hgr6207	F: *AAGTATGTGCATGTGAAAAGGAG R: CCTAGGCCTATGAGATTTGTGG	(CAGA) ₅	♀ 151-167 ♂ 147-175	HEX	50°C
Hgr21832	F: *AATGGTGAGCGAAACAAGC R: GCACCAAAGGCGAGTCTG	(GCCT) ₁₄	♀ 118-150 ♂ 118-130	PET	55°C
Hgr6685	F: *AGTTGGGCAGGTCAACTGG R: TCTTTGCATTGGAGCGATG	(ATCAC) ₄	♀ 168-183 ♂ 168-83	PET	50°C
Hgr10123	F: *ACCCCAGTGTGCCAGTATTC R: TGTTTGTAATCGTCGGTGTG	(CCTAGT) ₄	♀ 270-304 ♂ 270-310	6-FAM	50°C
Hgr18815	F: *TTGTGAAGAATTCAACCCTTGC R: CCCTGACAGAGTTCTGATTGTG	(GCAC) ₈	♀ 161-181 ♂ 157-181	NED	50°C
Hgr15607	F: *CTACGGCGTGGTTGTTC R: CGGAAATGCAGTTCAGTACTGAG	(TCG) ₇	♀ 288-303 ♂ 282-295	HEX	55°C
Hgr15269	F: *GCTGCTGCTTCTGCTCATAG R: TCTGATGACCTGATGAGTTTCG	(TCCTTC) ₄	♀ 282-288 ♂ 276-288	NED	60°C

* Indicates the presence of the tail M13, 5'-TGTAACGACGGCCAG-3'.

Table 2. Microsatellite characteristics found.

Classification of microsatellite	N° minimum of repetition	N° of sequences in males	Percentage (%) in males	N° of sequences in females	Percentage (%) in females
Trinucleotide	6	158	27,4%	201	27,2%
Tetranucleotide	5	210	36,4%	282	38,2%
Pentanucleotide	4	126	21,8%	163	22,1%
Hexanucleotide	4	83	14,4%	92	12,5%
Total	-	577	-	738	-

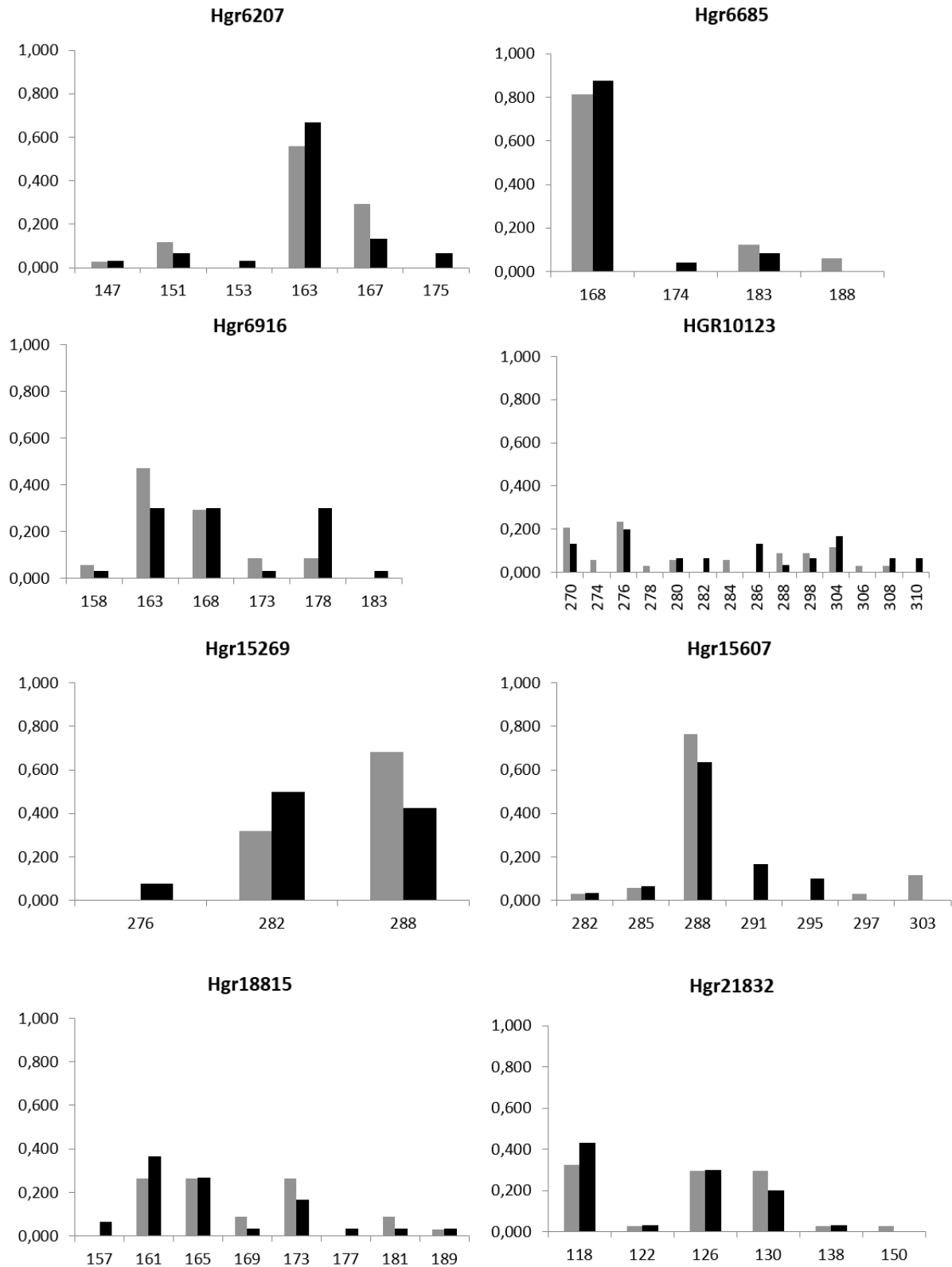
Table 3. Genetic variability data of *H. grisea* for the eight microsatellite loci.

	Hgr6916	Hgr6207	Hgr21832	Hgr6685	Hgr10123	Hgr18815	Hgr15607	Hgr15269	Média
<i>N</i>	32	32	32	28	32	32	32	24	30,5
<i>H_o</i>	0,688	0,688	0,813	0,321	0,906	0,625	0,156	0,417	0,577

H_e	0,718	0,570	0,707	0,283	0,878	0,774	0,488	0,531	0,619
N_a	6	6	6	4	14	8	7	3	6,750
N_e	3,543	2,325	3,408	1,394	8,225	4,423	1,954	2,133	3,426
HWE	0.417	0.510	0.116	1.000	0.173	0.041	0,000	0.028	0,000
F_{IS}	0,014	-0,226	-0,160	-0,145	-0,048	0,186	0,666	0,216	0,063

N , number of individuals genotyped; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; N_a , number of alleles detected; N_e , effective number of alleles; HWE , probability associated with Hardy-Weinberg equilibrium (bold value indicates significance after Bonferroni correction); F_{IS} , Wright inbreeding index.

Figure 1. Allelic frequencies for the microsatellite loci in males and females of a population of *H. grisea*. Dark gray bars indicate females; black bars indicate males.



8 CONCLUSÕES GERAIS

A *H. grisea* não possui dimorfismo sexual externo, porém, um dimorfismo comportamental pré-desova pode ser observado em fêmeas.

Os aspectos físico-químicos dos gametas e seus meios, possuem suas particularidades, mas segue o padrão morfológico e comportamental de diversas espécies de equinodermos autopomórficas.

Os marcadores serão úteis para subsidiar estratégias de conservação e exploração pesqueira, assim como para orientar e monitorar a produção destes animais em cativeiro.

Diferenças genéticas sugerem que um marcador, o loco Hgr15607, pode estar ligado à determinação do sexo nesses animais.

9 PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste estudo tem-se:

Ampliar os conhecimentos sobre a biologia reprodutiva dessa espécie, além disso poder subsidiar pesquisas de aplicabilidade desses conhecimentos em reprodução assistida, visando produção comercial em cativeiro ou em programas de repovoamento.

O conjunto de marcadores altamente polimórficos para o estudo populacional de *H. grisea*, podem servir de subsídio para estudo populacional em outras espécies de pepino do mar.

Utilizar esses marcadores para estudos populacionais na espécie *H. grisea* ao longo da costa brasileira.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, F.A.; ABDEL-RAHMAN, S.H.; EL-SHIMY, N.A.; OMAR, H.A. Reproductive biology of the tropical sea cucumber *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Red Sea coast of Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 31, n. 2, p. 383-402, 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERT, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th. ed. New York: Garland Science, 2002. 712 p.
- ALMEIDA, L.G. **Prospecção de marcadores moleculares sexo-específicos e análise de estrutura populacional de pirarucu (*Arapaima gigas*) na região de Santarém, Pará**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- ALKAMINE, J. Holothurian exploitation in the Philippines: continuities and discontinuities. **Tropics**, v. 10, n. 4, p. 591–607, 2001.
- ÁLVAREZ-GUERRERO, A.; MEDRANO, A.; MORENO-MENDOZA, N. Characterization of gametes in two phyllostomid bat species: *Artibeus jamaicensis* and *Sturnira lilium*. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 170–181, 2014.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2005.
- ASHA, P.S.; MUTHIAH, P. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria spinifera* (Echinodermata: Holothuroidea) from Tuticorin, Tamil Nadu, India. **Aquaculture International**, v. 16, n. 3, p. 231–242, 2008.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. 2th. ed. Sunderland, 2004. 684 p.
- BATTAGLENE, S.C.; SEYMOUR, J.E.; RAMOFAFIA, C.; LANE, I. Spawning induction of three tropical sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. **Aquaculture**, v. 207, p. 29-47, 2002.
- BECKMANN, J. S.; WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellite. **Genomics**, v. 12, p. 627–631, 1992.
- BELOVA, G.V.; VIKTOROVSKAYA, G.I. Morphometric Characteristic of Sex Cells and Seasonal Changes of Female Gonads of *Cucumaria japonica* (Semper, 1868) (Echinodermata: Holothuroidea) from Peter the Great Bay, Sea of Japan. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 33, p. 173-180, 2007.
- BOHONAK, A.J. Dispersal, gene flow, and population structure. **Quarterly Review Of Biology Journal**, v. 74, n. 1, p. 21-45, 1999
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 532p.

- BROWN, T.A. **Clonagem Genica e análise de DNA: uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2003. 376p.
- BUENO, M.L.; TAVARES, Y.A.T.; DOMENICO, M.D.; BORGES, M. Gametogenesis and weight change of body organs of the sea cucumber *Holothuria (Halodeima) grisea* Aspidochirotida: Holothuriidae) in Southern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v.63, p. 285–296, 2015.
- BUSO, G.S.C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2005. 22 p.
- CATALAN, M.A.B.; YAMAMOTO, M. Annual reproductive cycle of the Japanese holothurian *Eupentacta chironjelmii*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 2, p. 387–396, 1994.
- CHEN, L.; LI, Q.; YANG J. Microsatellite genetic variation in wild and hatchery populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) from northern China. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 1541-1549, 2008.
- CHEN, L.; LI, Q. Identification and characterization of microsatellite markers derived from expressed sequence tags of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 1057–1059, 2007.
- CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, p. 1-29, 2006
- COCKERHAM, C.; WEIR, B. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, v. 47, n. 3, p. 855-863, 1993.
- CONAND, C. The fishery resources of Pacific island countries. 2th. ed. Roma: FAO, 1990. 142 p.
- CONAND, C; MOREL, C; MUSSARD, R. A new study of asexual reproduction in holothurians: Fission in *Holothuria leucospilota* populations on Reunion Island in the Indian Ocean. **SPC Beche-de-mer inf Bull**, v. 9, p. 5–11, 1997.
- CONAND, C. Sea cucumber biology: taxonomy; distribution; biology; conservation status. p. 33–50 In: Bruckner A.W. (ed). Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae. **NOAA Technical Memorandum**, p. 244, 2006.
- CONAND, C.; UTHICKE, S.; HOAREAU, T. Sexual and asexual reproduction of the holothurian *Stichopus chloronotus* (Echinodermata): A comparison between La Réunion (Indian Ocean) and east Australia (Pacific Ocean). **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 41, p. 235-242, 2002.
- COSTA, P. B. **Sobrevivência, crescimento e capacidade de reciclagem de matéria orgânica do pepino do mar *Holothuria grisea* Selenka 1867 (Echinodermata:**

Holothuroidea: Aspidochirodita). 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CHAO, S. M.; CHEN, C. P.; ALEXANDER, P. S. Fission and its effect on population structure of *Holothuria atra* (Echinodermata: *Holothuroidea*) in Taiwan. **Marine Biology**, v. 116, p. 109–115, 1993.

DABBAGH, A.R.; SEDAGHAT, M.R. Breeding and rearing of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Iran. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 32, p. 49-52, 2012.

DAI, G.; LI, Z.B.; SHANGGUAN, J.B.; NING, Y.F.; DENG, H.W.; YUAN, Y.; HUANG, Y.S.; YANG, H.; LU, J. Development and characterization of polymorphic microsatellite loci in the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 538-541, 2015

DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Nature Publishing Group**, v. 93, p. 504-509, 2004

DEICHMANN, E. The Holothuroidea collected by the Velero III and IV during the years 1932 to 1954. Part II. Aspidochirota. **Allan Hancock Pacific Expeditions**, v. 11, n.2, p. 239-349, 1958.

DIAS, I.F. **Taxonomia e Distribuição de Holothuroidea (Echinodermata) na costa cearense**. 2009. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

DIAS, I.F. **Distribuição espaço temporal e densidade populacional de *Holothuria (Halodeima) grisea* (Holothuroidea: ASPIDOCHIRODITA) na praia de Bitupitá, Ceará, Nordeste do Brasil**. 2012. 71 f. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

DINIZ, F.M.; MACLEAN, N.; PATERSON, I.G.; BENTZEN, P. Polymorphic tetranucleotide microsatellite markers in the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*. **Molecular Ecology Notes**, v.4, 327-329, 2004.

DINIZ, F.M.; MACLEAN, N.; OGAWA, M.; PATERSON, I.; BENTZEN, P. Microsatellites in the overexploited spiny lobster, *Panulirus argus*: Isolation, characterization of loci and potential for intraspecific variability studies. **Conservation Genetics**, v.6, 637-641, 2005.

DOMÍNGUEZ-GODINO, J.A.; SLATER, M.J.; HANNON, C.; GONZÁLEZ-WANGÜERMERT, M. A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. **Aquaculture**, v. 438, p. 122-128, 2015.

DRUMM, D.J.; LONERAGAN, N.R. Reproductive biology of *Holothuria leucospilota* in the Cook Islands and the implications of traditional fishing of gonads on the population. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 39, n. 1, p. 141–156, 2005.

DU, H.; BAO, Z.; HOU, R.; WANG, S.; SU, H.; YAN, J.; TIAN, M.; LI, T.; WEI, W.; LU, W.; HU, X.; WANG, S.; HU, J. Transcriptome Sequencing and Characterization for the Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867). **Plos one**, v. 7, n. 3, p. 1-10, 2012.

EBERT, T.A. Recruitment in echinoderms. In: JANGOUX, M.; LAWRENCE, J.S (Eds) **Echinoderm studies**. Califórnia: Balkeema, 1983. p. 169–203.

ECKELBARGER, K.J.; RISER, N.W. Derived sperm morphology in the interstitial sea cucumber *Rhabdomolgus ruber*, with observations on oogenesis and spawning behavior. **Invertebrate Biology**, v. 132, n. 3, p. 270–281, 2013.

EMSON R.H.; WILKIE I. C. Fission and autotomy in echinoderms. Oceanography. **Marine Biology**, A. Review, v. 18, p.155–250, 1980.

EXCOFFIER, L.G.; LAVAL.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p. 47-50, 2005. Disponível em: < <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>>. Acesso em: 06 abr. 2016.

FABINYI, M. Historical cultural and social perspectives on luxury seafood consumption in China. **Environmental Conservation**, v. 39, p. 83–92, 2012.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1998. 220p.

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP. Cristália recebe investimento em 4 projetos. **Revista Inovação em pauta**, n. 2, p. 55-56, maio, 2008.

FITCH, A.J.; LEEWORTHY, G.; LI, X.; BOWMAN, W.; TURNER, L.; GARDNER, M.J. Isolation and characterisation of eighteen microsatellite markers from the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata : Holothuriidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 60, p. 368–371, 2012.

FRANK, M.Y.; NAXIN, H.; YONG, Q.G.; MING-CHENG, L.; YAQIN, M.; DAVE, H.; GERARD, R.L.; JAN, D.; OLIN, D.A. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer designi. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 253, 2008.

FRANZEN, A. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. **Zoologiska Bidray Uppsala**, v. 31, p. 355-482, 1956.

FUJIWARA, A.; YAMANO, K.; OHNO, K.; YOSHIKUNI, M. Spawning induced by cubifrin in the Japanese common sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Fisheries Science**, v. 76, p. 795-801, 2010.

GARDNER, M. G.; FITCH, A.J.; BERTOZZI, T.; LOWE, A.J. Rise of the machines – recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 1093–1101, 2011.

GASQUES, L.S.; BELONI, K.P.; OLIVEIRA, J.R. de. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do Scielo. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 16, n. 1, p. 47-50, jan./jun. 2013.

HADEL, V.F.; MONTEIRO, A.M.G.; DITADI, A.S.F.; THIAGO, C.G.; TOMMASI, L.R. Echinodermata. In: MIGOTTO, A.C.; THIAGO, C.G. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**, 3: Invertebrados Marinhos. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 260-271.

HAMEL, J-F.; HIMMELMAN, J.H.; DUFRESNE, L. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). **Biological Bulletin**, v. 184, n. 2, p. 125–143, 1996.

HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Gonad morphology and gametogenesis of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 8, p. 22-33, 1996b.

HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Mucus as a mediator of gametogenic synchrony in the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea: Echinodermata). **Journal of the Marine Biological Association UK**, v. 79, n. 1, p. 121-129, 1999.

HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Synchronomous gamete maturation and reliable spawning induction method in holothurians. In: LOVATELLI, A.; CONAND, C.; PURCELL, S.; UTHICKE, S.; HAMEL, J-F.; MERCIER, A (Eds). **Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management**. Roma: FAO Fisheries Technical Paper, 2004. p.359-371.

HAMILTON, M.B.; PINCUS, E.L.; DI FIORE, A.; FLESHER, R.C. A universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **BioTechniques**, v.27, p.500-507, 1999.

HATAKEYAMA, T.; NAGAMOTO, H.; YAMASAKI, N. Interaction of Hemolytic Lectin CEL-III from the Marine invertebrate *Cucumaia echinata* with the Erythrocyte Membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n.8, p. 3560-3564, 1995.

HENDLER, G.; MILLER, J.E.; PAWSON, D.L.; KIER, P.M. **Sea stars, sea urchins and allies: Equinoderms of Florida and the Caribbean**. [S.l.]: Smithsonian Institution Books, 1995. 392 p.

HERENCIA, F.; UBEDA, A.; FERRÁNDIZ, M.L.; TERCENIO, M.C.; ALCARAZ, M.J.; GARCÍA-CARRASCOSA, M.; CAPACCIONI, R.; PAYÁ, M. Antiinflammatory Activity in Mice of Extracts from Mediterranean Marine-Invertebrates. **Life Science**, v. 62, n. 9, p. 115-120, 1998.

HOOPER, D.L.; HUNTER, C.R.; RICHMOND, R.H. Sexual reproduction of the tropical sea cucumber, *Actinopyga mauritiana* (Echinodermata: Holothuroidea), in Guam. **Bulletin of Marine Science**, v. 63, n. 1, p. 1-9, 1998.

JACKSON, J.B.C. Distribution and ecology of clonal and aclonal benthic invertebrates. In: JACKSON, J.B.C.; BUSS, L.W.; COOK, R.W (Eds). **Population biology and evolution of clonal organisms**. New Haven and London, Yale University Press, 1983. p. 297– 355.

JAMIESON, B.G.M. The spermatozoa of the Holothuroidea (Echinodermata): an ultrastructural review with data on two Australian species and phylogenetic discussion. **Zoologica Scripta**, v. 14, n. 2, p. 123–135, 1985.

- KANG, J.H.; KIM, Y.K.; KIM, M.J.; PARK, J.Y.; AN, C.M.; KIM, B.S.; JUN, J.C.; KIM, S.K. Genetic Differentiation among Populations and Color Variants of Sea Cucumbers (*Stichopus Japonicus*) from Korea and China. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 3, p. 323-332, 2011.
- KANNO, M.; KIJIMA, A. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Fisheries Science**, v. 694, p. 806–812, 2003
- KANNO, M.; LI, Q.; KIJIMA, A. Isolation and Characterization of Twenty Microsatellite Loci in Japanese Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 179-183, 2005.
- KANNO, M.; SUYAMA, Y.; LI, Q.; KIJIMA, A. Microsatellite Analysis of Japanese Sea Cucumber, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, Supports Reproductive Isolation in Color Variants. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 672–685, 2006.
- KONDO, M.; AKASAKA, K. Current Status of Echinoderm Genome Analysis - What do we Know? **Currents Genomics**, v. 13, n. 2, p. 134–143, 2002.
- KORDICHEVA, S.Y.; RUBTSOVA, G.A.; SHITOVA, M.A.; SHAIKHAEV, G.O.; AFANASIEV, K.I.; ZHIVOTOVSKY, L.A. A search for null alleles at the microsatellite locus of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). **Russian Journal of Genetics**, v. 46, n. 8, p. 1019–1022, 2010.
- KUZNETSOVA, T.A.; ANISIMOV, M.M.; POPOV, A.M.; BARANOVA, S.I.; AFYIATULOV, S.H.; KAPUSTINA, I.I.; ANTONOV, A.S.; ELYAKOV, G.B. A comparative study in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of echinoderm type. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 73, n.1, p. 41-43, 1982.
- LAMBERT, P. **Sea Cucumber of British Columbia, Southeast Alaska and Puget Sound Royal British Columbia Museum Hand Book**. Vancouver: UBC Press, 1997. 166p.
- LAWRENCE, J.M. **A functional biology of echinoderms**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1987. 340 p.
- LAWRENCE, J.M.; HERRERA, J. Stress and deviant reproduction in echinoderms. **Zoology Studies**, v. 39, p. 151–171, 2000.
- LEITE-CASTRO, L.V.; JUNIOR, J.S.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; NUNES, J.F.; HAMEL, J-F.; MERCIER, A. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria grisea* in Brazil: importance of social and environmental factors in breeding coordination. **Marine Biology**, v. 67, p. 1-13, 2016.
- LIAO, M.; WANG, Y.; RONG, X.; ZHANG, Z.; LI, B.; WANG, L.; CHEN, G. Development of New Microsatellite DNA Markers from *Apostichopus japonicus* and Their Cross-Species Application in *Parastichopus parvimensis* and *Pathallus mollis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 5862-5870, 2011.

LIMA-VERDE, J.S. Primeira contribuição ao inventário dos Echinodermas do Nordeste Brasileiro. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 9, n.1, p. 9-13, 1969.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 395p.

LIU, P. Polymorphic analysis of microsatellite DNA in wild population of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 6, p. 556-562, 2006.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A.D. Microsatellite primers for three Western Atlantic *Farfantepenaeus* prawn species. **Molecular Ecology**, v.2, p. 51-53, 2002.

MANGION, P.T.D.; FROUIN, P.; CONAND, C. Feeding rate and impact of sediment reworking by two deposit feeders *Holothuria leucospilota* and *Holothuria atra* on fringing reef (Reunion Island, Indian Ocean). In: HEINZELLER.; NEBELSICK (Eds). **Echinoderms**. London, Taylor and Francis Group, 2004, p. 311-317.

MARDIS, E.R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. Annu. Rev. **Genomics and Humans Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008.

MARQUES, C. G. **Prospecção de marcadores microsatélites em *Litopenhaeus vannamei* e análise da diversidade genética em duas famílias de referência de camarões cultivados**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) -Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2009.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009.

MARTINS, J. M. **Prospecção de locos microsatélites e análise da variabilidade genética em uma população do Mato Grosso do Sul, visando a conservação da Arara Vermelha *Ara chloroptera* (Psiitacidae, Aves)**. 2009. 81 f. (Mestrado em Genética e Evolução) - Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2009.

MCEUEN, F. Spawning behaviors of northeast Pacific sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata). **Marine Biology**, v. 98, p. 565-585, 1988.

MELO, A.A.; CARNEIRO, F.R.; SILVA, W.M.; MOURA, R.M.; SILVA, G.C.; SOUSA, O. V.; SABOYA, J.P.S.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.64, p. 435- 442, 2014.

MENDES, F.M.; MARENZI A.W.C.; DOMENICO, M.D. Population patterns and seasonal observations on density and distribution of *Holothuria grisea* (Holothuroidea: Aspidochirotida) on the Santa Catarina Coast, Brazil. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v.23, 5-10, 2006.

- MENKER, D. Lebenszyklus, Jugendentwicklung und Geschlechtorgane von *Rhabdomolgus ruber* (Holothuroidea: Apoda). **Marine Biology**, v. 6, n. 2, p. 167–186, 1970.
- MERCIER, A.; BATTAGLENE, S.C.; HAMEL, J-F. Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Solomon Islands. **Hydrobiologia**, v. 440, p. 81-100, 2000a.
- MERCIER, A.; HAMEL, J-F. Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. **Advances in Marine Biology**, v. 55, p. 1–302, 2009.
- MERCIER, A.; HAMEL, J-F. Synchronized breeding events in sympatric marine invertebrates: role of behavior and fine temporal windows in maintaining reproductive isolation. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 64, p. 1749-1765, 2010.
- MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 118 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Escola Superior de Aquicultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- MEZALI, K.; SOUALILI, D.L.; NEGHLI, L.; CONAND, C. Reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Holothuroidea: Echinodermata) in the southwestern Mediterranean Sea: interpopulation variability. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 58, n. 3, p. 179-189, 2014.
- MICKOLS, D.A.; FREYER, G.A.; CROTTY, D.A. **A ciência do DNA**. 2. ed. ArtMed, 2006. p. 108 - 125.
- MILLER, M.P.; KNAUS, B.J.; MULLINS, T.D.; HAIG, S.M. *_pipeline*—Computer software for the identification of microsatellite sequences from paired-end Illumina High-Throughput DNA sequence data (ver. 1.1, February 2014): **U.S. Geological Survey**, 2013.
- MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.S.; HETZEL, D.J. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, p. 654-660, 1991.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWEL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 194-200, 2002.
- MOROZOVA, O.; MARRA, M.A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, p. 255-264, 2008.
- MOURA, R.M.; ARAGÃO, K.; MELO, A.; CARNEIRO, R.F.; OSÓRIO, C.B.H.; LUZ, P.B.; QUEIROZ, A.F.S.; SANTOS, E.A.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S. *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.27, p. 656–668, 2013.
- MOURÃO, P.A.S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 967-981, 2004.

NAVARRO, P.G.; GARCÍA-SANZ, S.; TUYA, F. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). **Scientia Marina**, v. 76, n. 4, p. 741-752, 2012 doi: 10.3989/scimar.03543.15B

NELSON, J.; COOPER, G.; GARNER, T.; SCHNUPF, P. Polymorphic markers for the sea cucumber *Parastichopus californicus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 233-235. 2002

NORRIS, A.T.; BRADLEY, D.G.; CUNNINGHAM, E.P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. **Aquaculture**, v. 182, p. 73–83, 2000.

OLIVEIRA, J.O.; CHRISTOFFERSEN, M.L. *Holothuria (Semperothuria) surinamensis* Ludwig, 1875 (Echinodermata: Holothuroidea): Record of the species for the northeast coast of Brazil. **Journal of species lists and distribution**, v. 8, n. 4, p. 768–770, 2012.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.

OMAR, H.A.; ABDEL, R.F.A.; ABDEL, R.S.H.; EL, S.N.A. Reproductive periodicity of sea cucumber *Bohadschia vitiensis* (Echinodermata: Holothuroidea) in Hurghada area, Red Sea, Egypt. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, p. 115–123, 2013

PARCHMAN, T.L.; GEIST, K.S.; GRAHNEN, J.A.; BENKMAN, C.W.; BUERKLE, C.A. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. **BMC Genomics**, v. 11, p. 180, 2010.

PAWSON D. L. Ecology of holothurians. In: BOOLOOTIAN, R.A. (Ed). **Physiology of Echinodermata**. New York: Interscience Publishers, John Wiley & Sons, 1996. 822 p.

PAWSON, D. L. **Holothuroidea**: Synopsis and classification of living organisms. New York, McGraw-Hill, 1982. p 147-166.

PAWSON, D.L. Phylum Echinodermata. **Zootaxa**, v. 1668, p. 749-754, 2007.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

PETZELT, C. Are Echinoderms of Interest to Biotechnology? In: MATRANGA, V. (Ed). **Echinodermata**. New York: Springer-Verlag, 2005, p. 1-5.

POLIDO, P.B.; FERREIRA, F.G.; ALBERTON, O.; SOUZA, S.G.H. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 161-169, jul./dez. 2012.

PURCELL, S.; MERCIER, A.; CONAND, C.; HAMEL, J-F.; TORAL-GRANDA, M.V.; LOVATELLI, A.; UTHICKE, S. Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. **Fish and Fisheries**, v. 14, p. 34–59, 2013.

PURWATI, P.; LUONG-VAN, J.T. Sexual reproduction in a fissiparous holothurian species, *Holothuria leucospilota* Clark 1920 (Echinodermata: Holothuroidea). **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 18, p. 33–38, 2002.

PETERS-DIDIER, J.; PARDO, L.M.; GARRIDO, O.; GALLARDO, C.S. Reproductive biology of the comercial sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida) in southern Chile. **Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom**, p. 1-13, 2016.

RAMOFAFIA, C.; BATTAGLENE, S.C.; BELL, J.D.; BYRNE, M. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Solomon Islands. **Marine Biology**, v. 136, p. 1045-1056, 2000.

RAMOFAFIA, C.; BYRNE, M.; BATTAGLENE, C.S. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. **Marine Biology**, v. 142, p. 281–288, 2003.

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

RICE, W. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989.

ROBINSON, G.; LOVATELLI, A. Global sea cucumber fisheries and aquaculture FAO's inputs over the past few years. **FAO Aquaculture Newsletter**, v. 53, p. 55-57, 2015.

ROCHA, R.M. Echinodermata In: RIBEIRO-COSTA, C.S.; ROCHA, R.M. **Invertebrados: manual de aulas práticas**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2005.

ROMANA-EGUIA, M.R.R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z.U.; TANIGUCHI, N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. **Aquaculture Research**, v. 36. n. 1, p. 69–78, 2005

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 103-106, 2008. Disponível em: < <http://genepop.curtin.edu.au/>>. Acesso em: 06 abril 2016.

RUPPERT, S.A.; FOX, R.S.; BARNERS, R.D. **Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional evolutiva**. 7. ed. São Paulo: Rocca, 2005. 1145 p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

SANTOS, R.; DIAS, S.; PINTEUS, S.; SILVA, J.; ALVES, C.; TECELÃO, C.; PEDROSA, R.; POMBO, A. Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 7, p. 2307–2323, 2015.

SCHNEIDER, K.S.; SILVERMAN, J.; WOOLSEY, E.; ERIKSSON, H.; BYRNE, M.; CALDEIRA, K. Potential influence of sea cucumbers on coral reef CaCO₃ budget: a case study at One Tree Reef. **Journal of Geophysical Research**, v. 116, 2012.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, p. 863-864, 2011.

SCHOLOTTERER, C. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? **Dispatch**, v. 8, p. 132-134, 1998.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1-2, 2000

SHANGGUAN, J.B.; LI, Z.B.; NING, Y.F.; HUANG, Y.S.; YUAN, Y.; LU, J.; LI, B.B.; MAO, X.Q. Screening and characterization of novel polymorphic microsatellite markers from sea cucumber *Holothuria leucospilota*. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, p. 6555-6560, 2015.

SHAO, M.Y.; ZHANG, Z.F.; YU, L.; HU, J.J.; KANG, K.H. Cryopreservation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) sperm. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 14, p. 1450-1457, 2006.

SHIELL, G.; UTHICKE, S. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria whitmaei* (Holothuroidea: Aspidochirotida) in the Indian and Pacific Ocean regions of Australia. **Marine Biology**, v. 148, p. 973-986, 2006.

SILVA, S.P.B. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em uma espécie de roedor da tribo akodontini, *Akodon montensis* (rodentia: cricetidae)**. 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.

SUN, G.Q.; LI, L.; YI, Y.H.; YUANA, W.H.; LIUA, B.S.; WENGA, Y.Y.; ZHANGA, S.L.; SUNA, P.; WANGA, Z.L. Two New Cytotoxic Nonsulfated Pentasaccharide Holostane ($\frac{1}{4}$ 20-Hydroxylanostan-18-oic Acid g-Lactone) Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria grisea*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 1453-1460, 2008.

SUN, C.; LI, Y.; WU, Q.; LUO, H.; SUN, Y.; SONG, J.; LUI, E.M.; CHEN, S. De novo sequencing and analysis of the American ginseng root transcriptome using a GS FLX Titanium platform to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis. **BMC Genomics**, v.11, p. 262, 2010.

TENEVA, A. Molecular markers in animal genomeanalysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, n. 5-6, p. 1267-1284, 2009.

THORNE, B.V.; ERIKSSON, H.; BYRNE, M. Long term trends in population dynamics and reproduction in *Holothuria atra* (aspidochirotida) in the southern great barrier reef; the importance of asexual and sexual reproduction. **Journal Of The Marine Biological Association of The United Kingdom**, v. 93, n. 4, p. 1067-1072, 2012.

THORSON, G. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. **Biological Reviews**, v. 25, p. 1-45, 1950.

TO, A.W.; SHEA, S.K. Patterns and dynamics of bêche-de-mer trade in Hong Kong and mainland China: implications for monitoring and management. **Traffic Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 65–76, 2012

TOMMASI, L. R. Lista dos holothuroidea recentes do Brasil. Contribuições Avulsas do Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo, **série Oceanografia Biológica**, São Paulo, n.15, p.1-29,1969.

UTHICKE, S. Seasonality of asexual reproduction in *Holothuria atra*, *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus*. (Holothuroidea – Aspidochirotida) on the Great Barrier Reef. **Marine Biology**, v. 129, p. 435–441, 1997.

UTHICKE, S. Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria (Halodeima) atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. **Bulletin of Marine Science**, v. 64, p. 129-141, 1999.

UTHICKE, S. The process of asexual reproduction by transverse fission in *Stichopus chloronotus* (greenfish). **SPC Beche-de-Mer Information Bulletin**, v. 14, p. 23–25, 2001a.

UTHICKE, S. Interactions between sediment-feeders and microalgae on coral reefs: grazing losses versus production enhancement. **Marine Ecology Progress Series**, v. 210, p. 125–138, 2001b.

UTHICKE, S.; CONAND, C. Local examples of beche-de-mer overfishing an initial summary and request for information. **SPC Beche-de-mer Inf Bull**, v. 21, p. 9-14, 2005.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P.F. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

WATTIER, R.; ENGEL, C.R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1569–1573. 1998.

YANG, W.; KANG, X.; YANG, Q.; LIN, Y.; FANG, M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, p. 2, 2013.

YANG, T.; BAO, S.Y.; FORD, R.; JIA, T.J.; GUAN, J.P.; HE, Y.H.; SUN, X.L.; JIANG, J.Y.; HAO, J.J.; ZHANG, X.Y.; ZONG, X.X. High-throughput novel microsatellite marker of faba bean via next generation sequencing. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1-11, 2012.

YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y.; KONDOH, D.; KUZUMA, Y.; GHOSH, A.K.; JACOBS-LORENA, M.; SINDER, R.E. Hemolytic C-Type Lectin CEL-III from Sea Cucumber Expressed in Transgenic Mosquitoes Impairs Malaria Parasite Development. **PLoS Pathogens**, v.3, p. 1962-1970, 2007.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, n.1, p.1-16, 2002.

ZHAN, A.; BAO, Z.; LU, W.; HU, X.; PENG, W.; WANG, M.; HU, J. Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 1345–1348, 2007.