



ISADORA MARQUES PAIVA

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO E
VARIABILIDADE GENÉTICA EM UMA
POPULAÇÃO DE *Astronotus ocellatus*
(Agassiz, 1831) POR MARCADORES ISSR**

LAVRAS - MG

2015

ISADORA MARQUES PAIVA

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO E VARIABILIDADE GENÉTICA EM UMA
POPULAÇÃO DE *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) POR
MARCADORES ISSR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Paiva, Isadora Marques.

Identificação do sexo e variabilidade genética em uma população
de *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) por marcadores ISSR /
Isadora Marques Paiva. – Lavras : UFLA, 2015.

55 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Marcadores moleculares. 2. Sexagem. 3. Diversidade. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ISADORA MARQUES PAIVA

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO E VARIABILIDADE GENÉTICA EM UMA
POPULAÇÃO DE *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) POR
MARCADORES ISSR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dra. Daniella Aparecida de Jesus Paula IFET – Rio Pomba

Dra. Dulcinéia de Carvalho UFLA

Dra. Josina Aparecida de Carvalho UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS - MG

2015

Aos que me apoiaram a cada decisão durante esta caminhada e dedicaram a mim, os maiores e melhores sentimentos: amor e compreensão.

Aos que abriram mão de mais conforto para que eu pudesse buscar meus objetivos e em nenhum momento mostraram arrependimento por isso.

Aos que me amaram acima de tudo.

Aos meus pais,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a toda a equipe do Biotério Central da UFLA, pelo esforço e disponibilidade em me ajudar na conclusão deste trabalho.

Ao Professor Luis Davis Solis Murgas pela orientação, por estar sempre calmo e disposto a me trazer de volta a uma realidade sempre mais simples que imaginava. E, principalmente, por sempre me incentivar a buscar o que quero. Saiba que você é um dos responsáveis por todo o sucesso profissional que alcancei até aqui e também pelos que ainda estão por vir.

Em especial, agradeço a Professora Dulcinéia de Carvalho não só pela disponibilidade em coorientar-me, mas também pela coragem de embarcar comigo em uma aventura, com uma espécie que nem imaginávamos como tudo funcionaria. Além dela, agradeço também aos amigos que fiz no Laboratório de Conservação Genética de Espécies Florestais, principalmente pelo apoio quando tudo parecia dar errado.

Às minhas amigas Tássia e Isadora pela amizade e ajuda, e claro, a Aline que, mesmo não estando de corpo presente, ajudou-me a cada passo da execução desta dissertação, levada, principalmente, pelo amor aos nossos “Oscarzinhos”.

Agradeço, ainda, a você Leonardo, por me aguentar durante minhas crises de ansiedade e ainda assim dedicar todo seu amor e carinho. E, por fim, agradeço a minha família, os maiores responsáveis pela formação do meu caráter.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Estudos que investiguem métodos alternativos para sexagem de espécies de peixe com dimorfismo sexual reduzido, como *Astronotus ocellatus*, são de extrema importância para facilitar técnicas de manejo da reprodução. Para isso, objetivou-se com esse estudo a determinação da viabilidade da sexagem manual, muito utilizada por piscicultores e aquarofilistas, e a identificação de marcadores moleculares específicos de determinado sexo utilizando marcadores ISSR. E, ainda, gerar dados de diversidade e similaridade genética para estudos de conservação. Foi feita a sexagem manual por análise macroscópica da papila urogenital. Amostras das nadadeiras e das gônadas de 30 exemplares ($\pm 83,32\text{g}$ e $\pm 15,96\text{ cm}$) de *A. ocellatus* foram coletadas para extração de DNA e histologia, respectivamente. Para a extração foi empregado o protocolo do NaCl (SAMBROOK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989). Amostras de qualidade foram utilizadas na amplificação com primers universais ISSR para posterior separação dos fragmentos gerados por eletroforese e avaliação dos índices de similaridade e diversidade genética. A sexagem manual não se apresentou como uma técnica viável para distinção dos sexos nessa espécie, pois se observaram 37% de erros durante a seleção. Da mesma forma, o perfil de bandas gerado pela amplificação de primers ISSR não permitiu a distinção de um padrão específico para um dos sexos. A porcentagem de polimorfismo encontrada (64,4%) e os índices H_e e I ($0,225 \pm 0,030$ e $0,375 \pm 0,044$, respectivamente) sugerem moderada diversidade, indicando que nem sempre populações em cativeiro marcam decréscimo na diversidade genética.

Palavras-chave: Marcadores moleculares. Sexagem. Peixe. Diversidade.

ABSTRACT

Studies conducted in order to investigate alternative methods for sexing fish species, such as *Astronotus ocellatus*, using reduced sexual dimorphism, are extremely important to facilitate reproduction management techniques. The objective of this study was to determine the feasibility of manual sexing, widely used by fish farmers and hobbyists, and the identification of specific molecular markers for a particular sex using ISSR markers. The latter technique also generates genetic diversity and similarity data, and is important for conservation studies. Manual sexing was performed by macroscopic analysis of the urogenital papilla. Fin and gonad samples of 30 *A. ocellatus* ($\pm 83,32\text{g}$ e $\pm 15,96\text{ cm}$) were collected for DNA extraction and histology, respectively. For DNA extraction, we adopted the NaCl protocol (SAMBROOK, 1989). Quality samples were used for amplification, using universal ISSR *primers* with subsequent separation of the generated fragments by electrophoresis, and assessment of similarity and genetic diversity levels. The manual sexing did not appear as a viable technique to distinguish the sexes for this species, given the occurrence of 37% of errors during selection. Likewise, the band profiles generated by the amplification with ISSR primers could not distinguish a specific pattern for one sex. The percentage of polymorphism (64,4%) obtained, as well as He and I indexes (0.225 ± 0.030 and 0.375 ± 0.044 , respectively) suggest moderate diversity, indicating that marked captive populations do not always decrease in genetic diversity.

Keywords: Molecular markers. Sexing. Fish. Diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplar de <i>Astronotus ocellatus</i>	23
Figura 2	Diferenças da estrutura das papilas entre machos e fêmeas de <i>Astronotus ocellatus</i>	26
Figura 3	Análise histológica das gônadas de <i>Astronotus ocellatus</i>	35
Figura 4	Produtos da amplificação de DNA de indivíduos de <i>Astronotus ocellatus</i> em gel de agarose a partir do primer UBC807.....	39
Figura 5	Dendograma baseado na similaridade genética entre indivíduos (O) de uma população de <i>A. ocellatus</i> , utilizando o índice de Jaccard.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escalas de maturação de células germinativas femininas e masculinas em peixes.....	24
Tabela 2	Parâmetros de qualidade avaliados para seleção de amostras DNA de qualidade	29
Tabela 3	Primers utilizados para amplificação do DNA de <i>Astronotus ocellatus</i>	30
Tabela 4	Primers ISSR selecionados para amplificação com suas sequências de bases, número total de fragmentos amplificados (locos ou bandas), conteúdo de bandas monomórficas e polimórficas e PL: porcentagem de polimorfismo dentro da população	37
Tabela 5	Estimativas dos índices de diversidade entre os primers selecionados dentro da população de <i>Astronotus ocellatus</i>	40
Tabela 6	Média dos índices de diversidade dentro da população de <i>Astronotus ocellatus</i>	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Espécie em estudo.....	14
2.2	Marcadores de DNA e identificação do sexo	15
2.3	Marcadores ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>)	17
2.4	Diversidade e similaridade genética em peixes.....	19
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	Objetivo Geral.....	21
3.2	Objetivos Específicos.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Coleta do material biológico e descrição do local.....	22
4.2	Identificação do sexo dos animais	23
4.2.1	Análise histológica	23
4.2.2	Exame macroscópico da papila urogenital (<i>Sexagem manual</i>).....	25
4.3	Extração do DNA	26
4.4	Integridade e quantificação do DNA extraído	28
4.5	Seleção dos Primers ISSR	29
4.6	PCR- ISSR.....	30
4.7	Eletroforese para separação dos amplicons.....	31
4.8	Genotipagem.....	31
4.9	Análises de dados.....	31
4.9.1	Diversidade Genética	32
4.9.2	Similaridade genética	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Identificação do sexo	33
5.2	Marcadores ISSR	36
5.3	Diversidade genética.....	39
5.4	Similaridade genética	42
6	CONCLUSÃO	44
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICES	53

1 INTRODUÇÃO

Astronotus ocellatus conhecido popularmente como Apaiari, Acará-Açu ou Oscar, é uma espécie da família Cichlidae, nativa da região da Bacia Amazônica. Apresenta crescente interesse econômico, em razão de suas características adequadas para pesca esportiva, produção e para piscicultura ornamental.

Tais características vislumbram um alto potencial para a implantação dessa espécie no cenário da aquicultura nacional. No entanto, há ainda poucos estudos disponíveis na literatura, especialmente no que diz respeito à reprodução, o que pode dificultar a consolidação do *A. ocellatus* no mercado brasileiro. Assim, projetos que visem a elucidar o comportamento, a ecologia, a reprodução e a genética dessa espécie mostram-se de grande valia para promover ainda mais o seu crescimento.

Um dos pontos chaves para estudos de reprodução de peixes é a identificação do sexo. Essa técnica é imprescindível para programas de reprodução artificial, desenvolvimento de estratégias de manejo e estudos de conservação das espécies.

Porém, diferentes espécies de peixes apresentam dimorfismo sexual reduzido, com diferenciação visível somente na época reprodutiva. E, além disso, não possuem cromossomos sexuais heteromórficos, características estas que dificultam a identificação do sexo. Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas alternativas à sexagem convencional (manual) torna-se extremamente necessárias.

Tais técnicas contribuem imensamente para programas de reprodução artificial, sobretudo nessa espécie onde a formação de casais durante a fase reprodutiva é essencial para a reprodução. No entanto, essa característica pode representar um entrave para a reprodução em cativeiro, uma vez que, a seleção

de machos e fêmeas só é possível durante a fase de reprodução, dificultando o estabelecimento prévio de casais.

A utilização de técnicas de biologia molecular pode auxiliar na resolução de problemas importantes como o da formação de casais pela da distinção de machos e fêmeas e ainda gerar dados de diversidade genética importantes para a conservação da espécie. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o uso dessas abordagens para estabelecer um método molecular de identificação do sexo em *A. ocellatus*, por meio da caracterização de marcadores de DNA. A identificação de sequências flanqueadoras a sequências simples repetidas (SSR) no DNA genômico dos animais, pela técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), tem se mostrado eficiente para estudos de diversidade e similaridade genética em peixes, assim como possibilita o desenvolvimento de marcadores de DNA ligados ao sexo.

Embora diversos trabalhos tenham sido desenvolvidos com o uso de marcadores de DNA em peixes, os estudos concentram-se, principalmente, na caracterização e identificação de espécies, híbridos e linhagens, além de estudos populacionais, ecológicos e de identificação de marcadores relacionados a genes de interesse econômico. O uso de marcadores específicos ao sexo, no entanto, é ainda restrito a determinadas espécies. Em *A. ocellatus*, no presente trabalho, representa-se um ineditismo nesse aspecto.

Baseado nos argumentos apresentados, este estudo teve como objetivo identificar métodos para sexagem de *Astronotus ocellatus* e ainda atribuir valores de diversidade genética a uma população da espécie, por meio de marcadores moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie em estudo

O *Astronotus ocellatus*, entre os diferentes ciclídeos, é uma das espécies consideradas de grande representatividade para o comércio. É um animal de grande interesse econômico, principalmente para a aquariofilia.

Essa espécie, popularmente conhecida como “Oscar” e “Apariri”, é nativa da América do Sul, sendo encontrada na bacia do rio Amazonas, incluindo Peru, Colômbia e Brasil e foi introduzida nas regiões Central e Sul do país (PAVANELLI, 2000). A sua climatização e disseminação iniciou-se em 1983, em açudes e rios do Nordeste brasileiro, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), sendo encontrado em quase todo o país (FONTENELE, 1982).

A família dos ciclídeos, na qual pertence o *A. ocellatus*, é um dos maiores grupos de teleósteos, pertencente à ordem Perciforme e está incluído entre as famílias de peixes com maior número de espécies (NELSON, 2006), sendo estimadas aproximadamente 3.000 espécies. O Oscar tem atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores por suas características desejáveis, como a grande adaptabilidade a diferentes ambientes e importância econômica para aquicultura mundial (KOCHER, 2004). Além disso, é um peixe bastante apreciado na região Norte e Nordeste do Brasil por apresentar carne saborosa, firme e sem espinhas intramusculares (GURGEL; FREITAS, 1973).

Em relação a sua morfologia, sua coloração varia do marrom ao vermelho-ferrugem, mas não é difícil encontrar indivíduos albinos. Em fase reprodutiva, essa coloração tende a se acentuar, principalmente o carmim na base do opérculo e nas faixas verticais. O corpo apresenta conformação robusta, achatado lateralmente. A região dorsal é espessa e sem espinhas intramusculares.

As nadadeiras dorsal e anal apresentam espinhos, e a nadadeira caudal é mais arredondada. A cabeça é pequena em relação ao corpo, com olhos grandes e linha lateral interrompida. O que caracteriza a espécie é um ocelo quase circular, de cor preta, orlada de vermelho-carmim, localizado no pedúnculo caudal próximo à inserção da nadadeira caudal (FONTENELE; NEPOMUCENO, 1983).

O *A. ocellatus* é uma espécie preferencialmente gregária, sendo que os alevinos e juvenis nadam em cardumes compactos, no entanto, animais adultos tendem a formar casais específicos e permanecem mais isolados. Em relação à reprodução, assim como diversos membros dos ciclídeos, o oscar apresenta cuidado parental, papel desempenhado principalmente pelas fêmeas. Os ciclídeos não apresentam um período reprodutivo bem definido e não apresentam dimorfismo sexual marcante, a não ser na durante a reprodução, quando algumas características podem diferenciar os sexos (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003).

Embora diferentes espécies de ciclídeos apresentem grande importância no âmbito da pesquisa, os dados sobre genômica ainda estão muito aquém do necessário. A maior parte das informações diz respeito à filogenia das espécies e estudos citogenéticos e de cariotipagem (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003). Particularmente em *A. ocellatus*, os estudos são bastante escassos, o que indica a importância de desenvolver novos projetos com o uso de marcadores de DNA.

2.2 Marcadores de DNA e identificação do sexo

A genética molecular vem adquirindo cada vez mais espaço no ramo científico. Os estudos com marcadores de DNA tiveram início em 1960 com a descrição da técnica de eletroforese para a análise de diferentes isoformas da

aloezima, proporcionando, assim, bases importantes para as análises genômicas (LEWONTIN; HUBBY, 1966). Com os avanços biotecnológicos, outros marcadores passaram a ser utilizados, dentre esses, os marcadores de DNA mitocondrial.

Posteriormente, em função da descoberta das enzimas de restrição e o avanço das técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), novas técnicas foram desenvolvidas para o uso de marcadores de DNA, tais como, RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*), microssatélites, RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*), SNPs (*Single nucleotide Polymorphism*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (LIU; CORDESB, 2004).

O desenvolvimento desses marcadores de DNA apresenta um impacto revolucionário em estudos genéticos em animais, sendo possível observar e explorar variações genéticas importantes dentro do genoma. Para a aquicultura, o uso desses marcadores contribui para o seu progresso em estudos de variabilidade genética, endogamia, atribuições de parentesco, identificação de espécies e construção de mapas genéticos de alta resolução (LIU; CORDESB, 2004).

Em relação à identificação de marcadores específicos ao sexo, diferentes metodologias foram propostas para algumas espécies de peixes. Por exemplo, o uso de marcadores de DNA mitocondrial e do cromossomo Y tem sido proposto para a identificação do sexo em fêmeas e machos, respectivamente (BRUNELLI; STEELE; THORGAARD, 2010). Em medaka (*Oryzias latipes*), o gene dmY/dmr1Y foram relacionados à diferenciação sexual nessa espécie (VOLFF; KONDO; SCHARTL, 2003), sendo comparável ao gene SrY responsável pela determinação testicular em mamíferos. Em salmonídeos, por sua vez, a identificação de marcadores de DNA específicos ao sexo demonstrou variabilidade molecular em cromossomos sexuais, especificamente no

cromossomo Y. Em salmão (*O. tshawtscha*) os genes *OtY1* e *OtY8* foram identificados como marcadores genéticos para o sexo (DEVLIN; BIAGI; SMAILUS, 2001).

Embora alguns marcadores ligados ao cromossomo Y terem sido identificados em algumas espécies, é importante ressaltar que uma pequena porcentagem (menor que 10%) das espécies de peixe apresenta cromossomos sexuais heteromórficos. Sendo assim, o conteúdo morfológico entre esses cromossomos é muito semelhante, o que dificulta encontrar marcadores específicos relacionados aos cromossomos. Além disso, nem todas as espécies apresentam os cromossomos sexuais associados à diferenciação sexual, sendo esse evento inerente aos cromossomos autossômicos (BRUNELLI; STEELE; THORGAARD, 2010). Nesse contexto, outros marcadores de DNA têm sido identificados por técnicas de AFLP (FELIP et al., 2005; WANG et al., 2009) e RAPD (CHEN et al., 2009a, 2009b; SILVA et al., 2012).

2.3 Marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

O ISSR é um método molecular que utiliza a amplificação de sequências por reação em cadeia da polimerase, e possibilita a determinação da diversidade e estrutura genética (dentro e entre populações) e auxilia no entendimento de padrões de fluxo gênico, dispersão e seleção (CAVERS et al., 2005; ROLDAN-RUIZ et al., 2000).

Os marcadores microssatélites, ou sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) são sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A premissa dessa técnica consiste que os primers ISSR alcancem essas sequências simples repetidas que estão dispersas abundantemente ao longo do genoma (ZIETKIWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994) amplificando as regiões

flanqueadoras, gerando grande quantidade de fragmentos polimórficos (GE et al., 2005).

Os perfis de ISSR são gerados a partir de PCR, para isso, é utilizado um único primer composto de di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídeos SSR repetidos, ancorados ou não por uma sequência 5' ou 3', de 1 a 3 nucleotídeos (GE et al., 2005; ZIETKIWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Durante a amplificação com o primer único, apenas uma das fitas do DNA é amplificada, produzindo múltiplos fragmentos de tamanhos variados (bandas), cujo padrão é analisado após separação por eletroforese, que permitirá determinar a variabilidade genética e se existir, um fragmento (loco) específico em machos ou fêmeas.

Por ser um marcador dominante, assim como são os RAPDs (Random amplified polymorphic DNAs) e os AFLPs (Amplified fragment length polymorphisms), nos ISSRs a presença do fragmento (banda) pode representar o homocigoto dominante ou o heterocigoto, enquanto a ausência pode ser decorrente do estado homocigoto recessivo (CULLEY; WOLFE, 2001).

Muitos estudos relatam que entre os marcadores dominantes, o uso do ISSR tem recebido grande projeção em estudos de genética de populações de plantas, fungos, insetos e vertebrados (NASCIMENTO et al., 2010; WOLFE, 2005).

Alguns estudos utilizaram marcadores ISSR para quantificar a diversidade genética em espécies de peixe. Saad et al. (2012) que avaliaram a diversidade genética entre quatro espécies de tilápia (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*, *Tilapia zillii* e *Sarotherodon galilaeus*) com o intuito de quantificar a variabilidade genética entre as populações e, ainda, identificar marcadores de DNA específicos de cada espécie. Yao-Ping et al. (2012) ao estudarem carpas, mostraram que com o passar das gerações (F0, F1, F2 e F3) a porcentagem de locos polimórficos e diversidade diminuem, trazendo sérios prejuízos para a conservação da espécie.

2.4 Diversidade e similaridade genética em peixes

Tanto a diversidade quanto a similaridade genética são índices utilizados na determinação da estrutura de uma população. A estrutura populacional de uma espécie é o conjunto de suas características genéticas e demográficas, sendo assim o resultado da ação e das interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (seleção, fluxo gênico, deriva genética, diferenciação de populações em ambientes heterogêneos, relacionando-os à distribuição dos indivíduos tanto no tempo como no espaço). Estudos dessa estrutura são importantes para a conservação dos recursos genéticos (MARTINS, 1987; YAZBECK, 2005).

Populações mantidas em cativeiro, como, por exemplo, pisciculturas ou criações para repovoamento devem ser fundadas a partir de um número suficientemente grande de indivíduos (ALLENDORF; RYMAN, 1987), a fim de evitar uma redução importante no tamanho efetivo da população (N_e). Populações grandes, fundadas a partir de grupos pequenos ou com contribuição desigual de progenitores podem exibir um N_e baixo (BRIESCOE et al., 1992). Baixos tamanhos efetivos populacionais são, provavelmente, uma das mais importantes causas da perda de variabilidade genética, em função da deriva genética (FRANKHAM, 1996).

A variabilidade genética é a base de grande parte de toda variação biológica. É a variabilidade genética que permite que populações submetidas a mudanças ambientais respondam às pressões ecológicas no sentido contrário à redução populacional e à extinção local. A manutenção da variabilidade intra e interpopulacional gera a diversidade genética, a qual deve ser uma meta de todos os programas de conservação e manejo de peixes (WANG; HARD; UTTER, 2002).

A diminuição da variabilidade genética com conseqüente aumento da similaridade entre indivíduos pode tornar, por exemplo, um programa de repovoamento ineficiente (baixa sobrevivência dos alevinos no ambiente aquático) e proporcionar danos genéticos irreversíveis nas populações naturais (POVH et al., 2008).

Assim, para manter a variabilidade genética nos estoques de reprodutores é necessária a introdução de novo material genético (reprodutores), os quais podem ser coletados a partir de populações naturais geneticamente diferentes ou também com o intercâmbio de reprodutores de outras estações de piscicultura (LOPERA BARRERO, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificação do sexo em *Astronotus ocellatus* e determinação da variabilidade genética dentro de uma população da espécie, utilizando marcadores ISSR.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a confiabilidade da sexagem manual na distinção dos sexos;
- b) Identificar os primers SSR compatíveis com a espécie;
- c) Avaliar a ocorrência de um padrão de bandas diferencial entre machos e fêmeas;
- d) Caracterizar um marcador molecular para sexo;
- e) Determinar a similaridade genética entre os indivíduos de *A. ocellatus* e a diversidade genética dentro da população.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material biológico e descrição do local

Trinta exemplares juvenis de *Astronotus ocellatus* (Figura 1) ($\pm 83,32$ g e $\pm 15,96$ cm), provenientes de uma piscicultura comercial (cativeiro) do município de Muriaé, localizado na região Sudeste de Minas Gerais foram utilizados para a realização deste estudo. Nessa piscicultura, os animais são mantidos em tanques escavados sem qualquer seleção e formação de casais para a reprodução, ou seja, os animais se reproduzem aleatoriamente se as condições oferecidas forem ótimas para tal processo.

Não há renovação de plantel nesses tanques, ou seja, não há fluxo gênico dentro da população.

Os animais obtidos foram mantidos no Laboratório de Produção e Manutenção de Peixes Ornamentais do Biotério, UFLA, em caixas d'água de 250L, por um período de 15 dias. Após isto, os espécimes foram transferidos para aquários de 40L e mantidos individualmente em sistemas com recirculação de água até o início do processo experimental.

As condições ideais de qualidade de água e bem-estar animal foram mantidas durante a manutenção dos animais no laboratório. Ainda é importante ressaltar que todos os procedimentos realizados com os animais foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Bioética para uso de animais da UFLA, protocolo número 052/2013.



Figura 1 Exemplar de *Astronotus ocellatus*

Para a coleta do material biológico, os animais foram pesados e eutanasiados com sobredose anestésica de benzocaína (250mg/kg). Após esse procedimento, foram coletadas, de forma asséptica, amostras da porção superior da nadadeira caudal de cada animal e armazenadas em etanol 99.8% a -20°C. Também foram coletadas as gônadas dos animais e fixadas em Bouin para posterior determinação do sexo dos mesmos por histologia.

4.2 Identificação do sexo dos animais

Os métodos adotados para identificação sexual serão descritos abaixo.

4.2.1 Análise histológica

Em decorrência do dimorfismo sexual reduzido, a determinação do sexo entre os espécimes foi realizada por meio da análise histológica das gônadas. Os fragmentos gonadais anteriormente fixados em Bouin foram transferidos para álcool etílico 70%. Cortes de 5 a 7 mm foram obtidos, fixados em parafina e

corados por Hematoxilina-eosina, segundo metodologia adotada pelo laboratório de Patologia – DMV, UFLA. A distinção do sexo e avaliação do estágio de maturação (Tabela 1) dos animais foram realizadas pela visualização em microscópio óptico.

Tabela 1 Escalas de maturação de células germinativas femininas e masculinas em peixes

Escala de maturidade feminina		Escala de maturidade masculina	
Fase 1	ovogônia	Fase 1	espermatogônias primárias
Fase 2	perinucleolar inicial	Fase 2	espermatogônias secundárias
Fase 3	perinucleolar avançado	Fase 3	espermátócito primário
Fase 4	pré-vitelogênico	Fase 4	espermátócito secundário
Fase 5	vitelogênico	Fase 5	espermátides
Fase 6	atrésico	Fase 6	espermatozóides

Fonte: (ANDRADE et al., 2001; WALLACE; SELMAN, 1981).

As ovogônias são células pequenas que permanecem agrupadas em ninhos, têm forma esférica e pouca basofilia; o ovócito perinucleolar inicial caracteriza-se por apresentar células de citoplasma escasso, núcleo grande e nucléolo geralmente único e muito basófilo. Os ovócitos perinucleolares avançados são formados por células de tamanho variado, geralmente com núcleo grande e muitos nucléolos fortemente basófilos; o pré-vitelogênico caracteriza-se pela presença de vesículas corticais próximas a membrana citoplasmática; os vitelogênicos são células maiores, com citoplasma abundante e repleto de vitelo e vários nucléolos periféricos; por último o atrésico determinado pela ruptura da membrana vitelina, células de baixa turgidez, sem forma definida (ZEIDEN, 2000).

Quanto à morfologia de cada fase das células germinativas masculinas temos que as espermatogônias primárias são células de maior tamanho dentro da linhagem germinativa, têm forma esférica, citoplasma abundante e hialino,

núcleo grande e com pequena afinidade a corantes, presença de nucléolo único. As secundárias são semelhantes às primárias, porém, têm menor tamanho e se agrupam em cistos. Os espermátócitos primários são derivados da diferenciação das espermatogônias secundárias, apresentam-se agrupados em cistos, citoplasma hialino, com limites distinguíveis. A diferença para os espermátócitos secundários é exatamente pela presença do complexo sinaptonêmico nesta quarta fase, além de serem células menores de difícil visualização, em razão da rápida progressão da meiose.

As espermátides são semelhantes aos espermátócitos secundários, um pouco menores e também localizada dentro dos cistos. Por último, os espermatozoides que são os menores tipos celulares da linhagem germinativa, podem ser encontrados ainda dentro dos cistos ou já livres na luz tubular. Se distinguem dos tipos celulares anteriores pela presença do flagelo (ZEIDEN, 2000).

Essa caracterização celular das fases de maturação das células germinativas de machos e fêmeas foi utilizada na determinação do grau (fase) de maturação em que os animais do presente estudo se encontravam.

4.2.2 Exame macroscópico da papila urogenital (Sexagem manual)

A sexagem manual é muito utilizada por piscicultores baseada na comparação dos orifícios urogenitais de machos e fêmeas. É possível observar dois orifícios (uretra e ânus) em machos, e estes são praticamente juntos e de mesmo tamanho, quase formando o número oito. Em contrapartida, as fêmeas possuem três orifícios, um menor (oviduto) e os outros dois (uretra e ânus) muito próximos e quase indistinguíveis formando uma estrutura maior. Os conjuntos dos orifícios das fêmeas têm a característica de serem mais alongados que em machos (Figura 2)

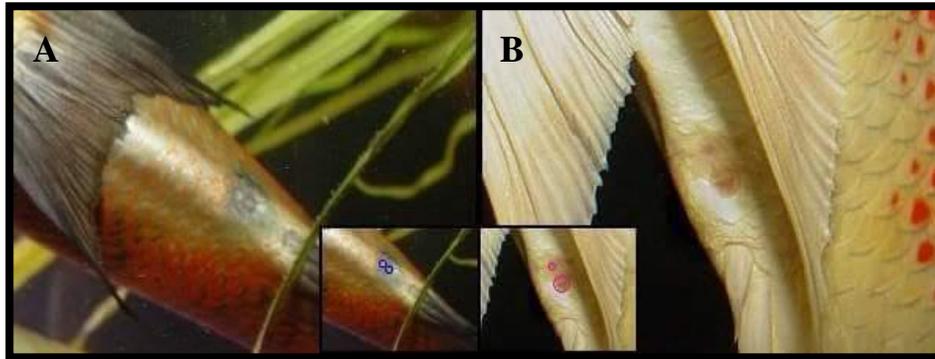


Figura 2 Diferenças da estrutura das papilas entre machos e fêmeas de *Astronotus ocellatus*

Fonte: Aqua Hobby (2015).

Baseado nessas diferenças, utilizaram-se dois profissionais experientes do Biotério para a execução desse tipo de sexagem. Foi contabilizada a porcentagem de acerto em relação à sexagem histológica e avaliaram se os erros na técnica estão correlacionados com o tamanho e/ou peso dos animais.

4.3 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído da parte superior da nadadeira caudal dos animais. Para chegar a um DNA de qualidade, foram testados diferentes protocolos, o primeiro utilizando o Kit comercial Wizard Genomic® DNA Purification Kit da Promega, porém, ao final do processo, o material genético obtido estava muito degradado.

Após muitas alterações de protocolos, soluções e temperaturas de incubação, chegou-se ao protocolo convencional descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), conhecido como protocolo do NaCl. Obtendo-se um DNA com quantidade e qualidade.

Para a extração do DNA, foi necessário o preparo de algumas soluções como o Buffer de Lise (50mM de Tris HCl, 50mM EDTA pH 8, 50mM de NaCl e 1% de SDS), a proteinase K (20mg/ml), NaCl (5M) e TE (Tampão Tris-EDTA) 1X pH 8, todo esse material foi autoclavado antes do uso. Além destes também foram utilizados álcool isopropílico e etílico absolutos a -20°C para as etapas de lavagem. Utilizou-se ainda RNase (10mg/ml) para degradar o RNA e dar mais pureza ao material extraído.

O protocolo de extração foi do material coletado e armazenado no etanol a -20°C consistiu em pesar em torno de 20 à 30mg de tecido (nadadeira), enxaguou-se bem com água destilada para remover o restante do etanol e, assim, transferiu o material para um tubo com 500µl de Buffer de Lise e 5µl de proteinase k. Feito isso, as amostras foram incubadas a 55°C em banho seco com agitação *overnight*. No dia seguinte, agregou-se 5µl de RNase deixando-a agir por mais uma hora à mesma temperatura.

Após todo esse procedimento, o material foi centrifugado a 13.000 rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e colocado em um tubo limpo com cuidado para não carrear o pellet ou a capa superficial oleosa. No novo tubo, foram acrescentados 300µl de NaCl, agitou-se brevemente e centrifugou-se por mais 15 minutos.

Mais uma vez, o sobrenadante foi repassado a um tubo limpo para dar início aos processos de lavagem. Acrescentaram-se 500-600µl de álcool isopropílico absoluto à -20°C e mesclou-se completamente. Para recuperar maior quantidade de DNA, esse material ficou armazenado a -20°C *overnight*.

Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas à 13.000 rpm por 15 minutos. Porém, a partir desse passo o sobrenadante é descartado, ficando somente com o pellet que contém o material genético. Mais uma etapa de lavagem foi feita com etanol absoluto, e mais uma centrifugação nas mesmas condições da anterior.

Após centrifugar, eliminou-se o etanol sobrenadante e deixou o restante evaporar à temperatura ambiente. Quando bem seco, ressuspendeu-se o pellet com 100µl de TE e incubou-se por duas horas a 55°C para que o material fosse todo ressuspenso. Ao final, o DNA extraído foi armazenado a -20°C.

4.4 Integridade e quantificação do DNA extraído

Para as análises de integridade, as amostras de DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE 1x (Tris-Ácido bórico-EDTA), corado com Brometo de Etídeo (10mg/ml) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (Hoefer UV-25). Para um DNA íntegro, observou-se uma única banda no gel, de alto peso molecular já que se trata do DNA genômico e sem qualquer tipo de arraste que indicasse degradação.

Quanto à quantificação do DNA, foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue™ Plus Spectrophotometer, que quantificou a concentração do DNA em ng/µl e ainda apresentou o grau de pureza da amostra, de acordo com a relação das absorbâncias 260/280 e 260/230. A taxa aceita para a relação dessas absorbâncias é de 1,8 a 2,2, fora dessa margem é indicativo de que o material estava contaminado com a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes.

Para este estudo, amostras de baixa qualidade foram descartadas (Tabela 2).

Tabela 2 Parâmetros de qualidade avaliados para seleção de amostras DNA de qualidade

Amostra	Concentração (ng/μl)	Relação 260/280	Relação 260/230	Amostra	Concentração (ng/μl)	Relação 260/280	Relação 260/230
1	1519,13	1,95	1,95	16	860,21	1,94	1,92
2	1387,73	2,03	2,01	17	582,11	1,93	2,11
3	917,91	1,99	2,03	18	620,37	1,91	2,05
4	308,69	1,98	2,08	19	752,42	1,89	1,83
5	627,58	1,87	2,01	20	752,91	2,00	1,98
6	569,95	1,87	1,91	21	738,58	1,96	1,99
7	767,19	2,00	1,84	22	287,24	1,90	2,08
8	656,65	1,87	1,86	23	494,88	1,90	2,03
9	820,75	1,99	2,22	24	1144,87	2,10	2,23
10	380,64	1,88	2,09	25	778,95	2,02	2,02
11	390,72	1,86	1,77	26	1117,92	2,14	2,10
12	386,53	1,73	1,33	27	1313,84	2,04	2,25
13	693,70	1,96	2,01	28	808,02	1,97	2,26
14	499,07	1,90	1,92	29	1023,48	2,05	2,16
15	768,17	2,00	1,92	30	1210,70	2,08	2,09

4.5 Seleção dos Primers ISSR

A seleção dos primers ISSR utilizados neste estudo foi feita baseada em busca na literatura. Como essa técnica ainda não havia sido aplicada para a espécie *Astronotus ocellatus*, utilizaram-se dados de primers para espécies da mesma família, como, por exemplo, a tilápia nos estudos de Saad et al. (2012) ou mesmo com outras espécies de peixes como nos trabalhos de Maltagliati et al. (2006) e Yao-Ping et al. (2012) com ciprinídeos.

Foram testados 25 primers (Tabela 1), dos quais somente os que foram amplificados, gerando padrão de bandas possível de se genotipar, e com menor número de dados perdidos foram utilizados neste trabalho.

Tabela 3 Primers utilizados para amplificação do DNA de *Astronotus ocellatus*

Primer	Sequência	Primer	Sequência
UBC807	(AG)8T	UBC841	(GA)8YC
UBC808	(AG)8C	UBC842	(GA)8YG
UBC809	(AG)8G	UBC843	(CT)8RA
UBC810	(GA)8T	UBC844	(CT)8RC
UBC811	(GA)8C	UBC848	(CA)8RG
UBC813	(CT)8T	UBC857	(AC)8YG
UBC814	(CT)8TG	UBC864	(ATG)6
UBC822	(TC)8A	UBC880	(GGAGA)3
UBC825	(AC)8T	UBC886	VDV(CT)7
UBC827	(AC)8G	John	(AG)7YC
UBC834	(AG)8YT	Manny	(CAC)4RC
UBC835	(AG)8YC	GCT4Y	(GCT)4Y
UBC840	(GA)8YT		

Onde: R= purina (A ou G) e Y= pirimidina (C ou T).

4.6 PCR- ISSR

A amplificação dos fragmentos de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-ISSR) foi conduzida em 13µl, constituindo aproximadamente 10-50ng de cada amostra de DNA, tampão de reação 1x (500mM Tris-HCl pH 8, 200mM KCl, 2,5 mg/ml BSA, 200mM Tartrazina e 1% de Ficoll), 2,6mM MgCl₂, 0,25mM de cada dNTP, 0,125U Taq DNA Polimerase (Phoneutria) e 0,4µM de primer ISSR.

O programa de amplificação constituiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, e de 37 ciclos com: desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 42° por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

4.7 Eletroforese para separação dos amplicons

Os fragmentos amplificados (amplicons) de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em solução de TBE (Tris-HCl – Ácido Bórico – EDTA), corado com brometo de etídio.

Após solidificação do gel, as amostras foram aplicadas nos devidos poços e deixou-se correr sob 80V de corrente elétrica e 300mA, por 2 horas e 10 minutos para completa separação e melhor visualização dos amplicons.

Após o tempo acima, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta e utilizado o software de análise de imagens *UVP Doc-It-LS*.

4.8 Genotipagem

A genotipagem foi realizada pela determinação da presença ou ausência de bandas específicas de cada primer, em cada animal. Tal processo gerou uma matriz binária com (1) indicando presença e (0) ausência do fragmento (APÊNDICE A), que, posteriormente, foi utilizada para calcular as estimativas de diversidade na população de *Astronotus ocellatus*. Somente dados inequívocos (alta nitidez das bandas) obtidos pelos fragmentos de DNA foram utilizados para análise.

4.9 Análises de dados

Os métodos utilizados para análise dos dados serão descritos abaixo.

4.9.1 Diversidade genética

Os parâmetros de diversidade genética: porcentagem de locos polimórficos (P), número de alelos efetivos (N_e), número de alelos observados (N_a), diversidade genética de Nei (H_e) e índice de Shannon (I) foram calculados usando o programa GenAlex v. 6,5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

4.9.2 Similaridade genética

A similaridade genética entre os indivíduos da população foi calculada com base no coeficiente de Jaccard com o auxílio do programa NTSYS v. 2.11X (ROHLF, 2000). A matriz de similaridade obtida foi usada para a construção de um dendograma, pelo método UPGMA (método de agrupamento de média aritmética não ponderada).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação do sexo

Para a identificação do sexo foram realizadas análises de viabilidade da sexagem manual e a de identificação de marcadores moleculares de DNA (ISSR) relacionados ao sexo. O resultado de ambas as técnicas foram comparados com a histologia das gônadas dos animais.

Pela histologia, dos 30 animais utilizados no estudo, em apenas 24 foi possível identificar o sexo, tendo sido obtidas as proporções de 14 fêmeas (71%) para 10 machos (29%). Os outros seis animais foram descartados para essas análises, pois o tecido não permitia a distinção de sexo ou era muito pequeno, o que impossibilitou a confecção das lâminas.

Esses animais, tanto machos quanto fêmeas, encontravam-se em estágios iniciais de maturação baseado na composição e desenvolvimento celular observado nas lâminas de gônadas (Figura 3). As fêmeas apresentavam, em sua maioria, ovócitos perinucleolares iniciais, com núcleo grande e visível, ausência de nucléolos e quantidade de citoplasma inferior aos outros tipos mais avançados. E quanto aos machos, são encontrados todos os tipos celulares, mas em sua maioria constituído por espermatócitos primários.

Na sexagem manual, técnica utilizada por piscicultores e aquarofilistas para distinguir os sexos e facilitar a formação de casais, obteve-se uma porcentagem de acerto (comparado a histologia) de 63%.

Comunicados feitos por piscicultores correlacionam o índice de acerto ao peso e tamanho desses animais, quanto maiores esses valores, maior taxa de acerto na sexagem. Para *A. ocellatus*, esses profissionais afirmam que em indivíduos com comprimento total corporal igual ou maior que 16 cm a probabilidade de acerto é alta (AQUA HOBBY, 2015). Tal afirmação não foi

confirmada por este estudo, onde os animais tinham comprimento variando entre 14,5 a 17,9 cm e o erro encontrado ainda foi alto, de 37%.

Quando se compara a sexagem manual em Oscars com outras espécies, a relação entre tamanho, peso e porcentagem de acerto, que aumenta a viabilidade da técnica, varia até em espécies da mesma família, como a Tilápia (*Oreochromis niloticus*). Para esta última, a diferenciação do sexo pelas diferenças na papila é possível até mesmo quando o peixe é pequeno, com comprimentos menores que 3,0 cm e pesando menos que 0,5 g (AFONSO; LEBOUTE, 1993). Para a espécie em estudo, a utilização de animais desse tamanho e peso provavelmente aumentaria o número de equívocos cometidos.

Mesmo assumindo os valores para tamanho e peso que tornam a sexagem manual mais viável, tanto em tilápia quanto em Oscar essa técnica ainda tem suas limitações, pois nunca é 100 % eficaz (BEARDMORE; MAIR; LEWIS, 2001; CARRILLO, 2004; POPMA; LOVSHIN, 1996) e mesmo com mão de obra especializada há, ainda, grande probabilidade de erro no momento da seleção, além do estresse causado aos animais. Desprez et al. (2003) afirmaram que esse método de identificação do sexo está em processo de desuso nas criações comerciais, por ser muito dispendiosa na análise animal por animal e com altas taxas de equívocos que levam a quedas na produção.

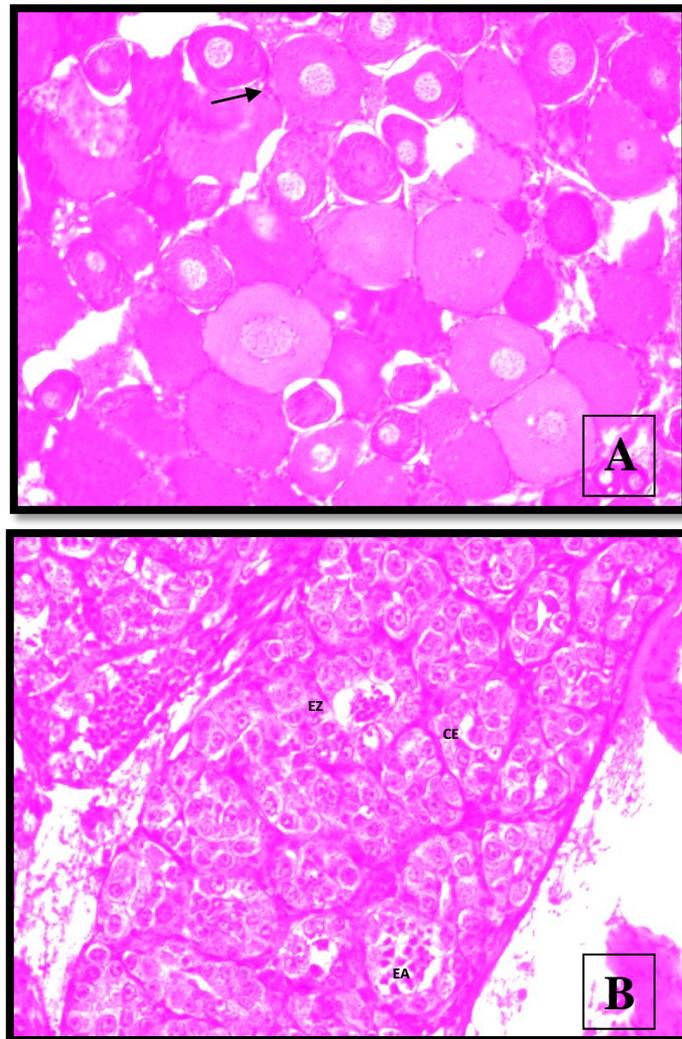


Figura 3 Análise histológica das gônadas de *Astronotus ocellatus*

Legenda: A: Fêmea em estágio inicial de maturação. Seta indicando ovócito mais abundante: ovócito perinucleolar inicial. B: Macho. CE: cistos espermáticos, EA: espermátides, EZ: espermatozoide. Fonte: arquivo pessoal.

5.2 Marcadores ISSR

Para os marcadores ISSR, dentro das condições experimentais utilizadas, não foi possível a identificação de fragmentos (locos) específicos de determinado sexo com os *primers* selecionados, ou seja, as regiões amplificadas pelos *primers* não apresentaram polimorfismos ligados a um sexo específico. Os dados gerados indicam polimorfismos somente entre os indivíduos da população.

Os marcadores ISSR oferecem vantagens, principalmente quanto a não necessidade de informação prévia do genoma da espécie estudada, pois utiliza como *primers*, sequências repetitivas conhecidas, presentes ao longo de todo o genoma. Porém, quanto maior o número de *primers* utilizados, pode-se obter uma informação mais detalhada (completa) do genoma do animal (CHIU et al., 2012), podendo até chegar a identificação polimorfismos relacionados ao sexo.

Outra limitação que possa ter impedido a diferenciação dos sexos por essa técnica, consistiu do fato do marcador ser do tipo dominante. Onde homozigotos e heterozigotos dominantes não são distinguíveis (HOLSINGER et al., 202), dificultando a identificação de algum caráter influenciado ou limitado por algum desses genótipos.

Nos estudos de diversidade genética de *Astronotus ocellatus*, foram testados 25 *primers*, dos quais nove (UBC807, UBC808, UBC810, UBC811, UBC822, UBC827, UBC840, John e Manny) foram selecionados por gerar padrão de bandas nítidas após amplificação. Os indivíduos que não apresentaram nenhum padrão de amplificação (ausência de bandas) foram considerados dados perdidos (-1) (APÊNDICE A), não contabilizados nas análises.

Os *primers* selecionados geraram 45 bandas, dos quais 29 foram polimórficos (64,4%) (Tabela 4). O número de bandas variou de 3 a 7, com média de 5. Para todas as bandas geradas (45), o valor encontrado para

porcentagem de polimorfismo (PL) é maior ou igual 50%, indicando que os marcadores são eficientes na identificação de polimorfismo entre os indivíduos.

Esse resultado foi consistente com achados anteriores para outras espécies, como no estudo de Wang et al. (2007) com *Haplochromis nitens* quando encontraram PL 55,17%. Fang et al. (2006), ao estudarem uma população de *Paralichthys olivaceus* em cativeiro (mesma situação da população em estudo) obtiveram PL de 69,57%, valor esse maior que para uma população natural, indicando que nem sempre populações em cativeiro marcam decréscimo na diversidade genética.

Tabela 4 Primers ISSR selecionados para amplificação com suas sequências de bases, número total de fragmentos amplificados (locos ou bandas), conteúdo de bandas monomórficas e polimórficas e PL: porcentagem de polimorfismo dentro da população

Primer	Sequência	Fragmentos (bandas)		
		Total	Monomórfico	Polimórficos
UBC807	(AG)8T	6	3	3
UBC808	(AG)8C	6	3	3
UBC810	(GA)8T	4	1	3
UBC811	(GA)8C	5	2	3
UBC822	(TC)8A	5	2	3
UBC827	(AC)8G	3	1	2
UBC840	(GA)8YT	4	1	3
John	(AG)7YC	7	1	6
Manny	(CAC)4RC	5	2	3
Total		45	16	29
PL				64,44

Onde: R= purina (A ou G) e Y= pirimidina (C ou T).

Apesar da porcentagem de polimorfismo encontrado ser considerada moderada, principalmente se tratando de uma população em cativeiro, seria

importante determinar o número de fragmentos gerados que estimem com boa precisão a diversidade (DUARTE, 2011). Neste estudo, o número de fragmentos encontrados para cada primer foi baixo de 3 a 7 e, portanto, provavelmente não prediz com fidelidade a real situação em que a população se encontra.

Entretanto, em um estudo de análise de similaridade genética entre espécies de tilápias de Saad et al. (2012), onde foram utilizados 12 *primers*, encontram uma média de 6 bandas para cada um, dados próximos aos obtidos no presente estudo. A média de polimorfismo 29 % ($\pm 10\%$) indicou alta similaridade entre as espécies (aproximadamente 93,15%). Na população de *A. ocellatus* a porcentagem de polimorfismo foi maior (64,4%), porém, a similaridade entre os indivíduos, conseqüentemente foi menor, cerca de 80%. Mesmo com um polimorfismo considerado moderado, pesquisas como essas demonstram a importância dos estudos populacionais em espécies nativas, principalmente para conservação. Em uma população como a de estudo, seria interessante aumentar o fluxo gênico dentro do grupo de indivíduos para inserção de novos alelos favoráveis, diminuindo as chances de exclusão de alelos por endogamia (já que estão em ambiente de cativeiro) e extinção.

Na Figura 4, apresenta-se o perfil de amplificação do *primer* UBC 807, permitindo a visualização das bandas monomórficas (presentes em todos os indivíduos, mesmo peso molecular) e polimórficas (indica a variabilidade entre os indivíduos, peso molecular diferente) da população de *A. ocellatus*. Para esse primer, obtiveram-se 50% de bandas polimórficas e 50% de monomórficas.

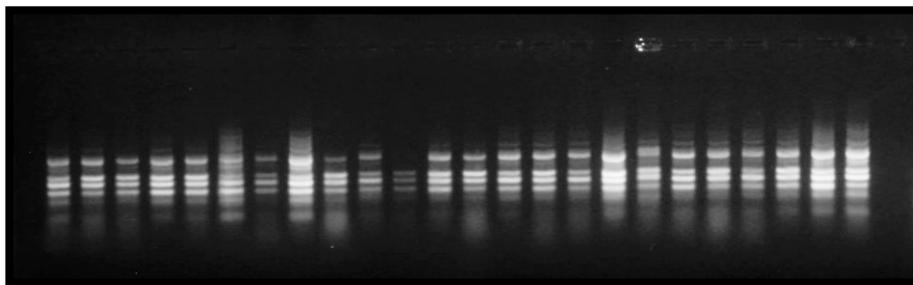


Figura 4 Produtos da amplificação de DNA de indivíduos de *Astronotus ocellatus* em gel de agarose a partir do primer UBC807

5.3 Diversidade genética

A diversidade genética de Nei (1978) (H_e), assumindo que a população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, variou de 0,182 (UBC 807) a 0,336 (John), e o índice de Shannon (I) de 0,273 a 0,529 respectivamente, nos mesmos *primers*. Esses dados corroboram com os resultados obtidos para a porcentagem de locos polimórficos, pois para o primer UBC807 o PL encontrado foi o menor (50% - alta porcentagem de bandas monomórficas), juntamente com UBC 808, confirmando, assim, os valores baixos de diversidade genética (H_e e I). Seguindo o mesmo raciocínio, o primer John apresentou o maior PL com maiores índices de diversidade (H_e e I) (Tabela 5.).

Na Tabela 5, pode-se observar que os valores de H_e e I variaram também de acordo com o número de alelos efetivos para determinado primer (N_e), ou seja, quanto maior a diversidade (H_e) mais alelos efetivos distintos naquela população. Conhecendo o conceito de alelo como formas alternativas de um gene, o maior número de alelos efetivos possibilita aumento do número de caracteres que podem ser expressos em uma determinada população.

A grande variação nos índices genéticos para cada *primer* pode ser explicada pela heterogeneidade genética gerada como nos resultados obtidos por Gasmí et al. (2014) com crustáceos, onde encontraram uma variação no índice

de Shannon de 0,25 a 0,36, de diversidade (He) de 0,17 a 0,23 e com PL igual a 74%.

Tabela 5 Estimativas dos índices de diversidade entre os primers selecionados dentro da população de *Astronotus ocellatus*

Primer	Índices de diversidade				
	N	Na	Ne	I	He
UBC807	30	1,500	1,293	0,273	0,182
UBC808	23	1,500	1,339	0,286	0,194
UBC810	24	1,750	1,385	0,409	0,276
UBC811	28	1,600	1,556	0,404	0,288
UBC822	23	1,600	1,401	0,346	0,234
UBC827	27	1,667	1,485	0,407	0,28
UBC840	30	1,750	1,362	0,378	0,243
John	29	1,857	1,662	0,529	0,366
Manny	25	1,600	1,384	0,338	0,227

Nota: N: número de indivíduos; Na: números de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; I: índice de Shannon e He: diversidade genética de Nei.

Na avaliação dos parâmetros genéticos dentro da população como um todo, encontrou-se valor médio de alelos efetivos igual a $1,443 \pm 0,06$ de He igual a $0,255 \pm 0,03$ e índice de Shannon igual a $0,375 \pm 0,04$ (Tabela 6).

Tabela 6 Média dos índices de diversidade dentro da população de *Astronotus ocellatus*

	Índices				
	N	Na	Ne	I	He
Médias	26,664	1,664	1,443	0,375	0,255
SE	$\pm 0,42$	$\pm 0,07$	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$	$\pm 0,03$

Nota: N: número médio de indivíduos; Na: número médio de alelos observados; Ne: número médio de alelos efetivos; I: índice de Shannon, He: diversidade genética de Nei e SE: desvio padrão.

Valores semelhantes foram encontrados por Jacometo et al. (2010) em estudos com Tambaqui mantidos em cativeiro, PL de (72,92 a 83,33%), diversidade genética de Nei (0,27 a 0,30) e índice de Shannon (0,39 a 0,45), Tais índices foram considerados moderados.

É esperado que, em populações mantidas em cativeiro, exista uma diminuição da variabilidade genética, em consequência do efeito da seleção intencional e do acasalamento entre parentais (LOPERA BARRERO et al., 2010), porém, os resultados do presente estudo não contêm evidências de baixa variabilidade.

Outros autores, que têm pesquisado a variabilidade genética de espécies nativas brasileiras mantidas em cativeiro, relataram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. Lopes et al. (2009) analisaram dois estoques de *C. macropomum*, oriundos do Estado de Rondônia, e encontraram valores maiores para o índice de Shannon (0,47 e 0,44) e percentagem de fragmentos polimórficos (77,0 e 75,0), e concluíram que existe alta variabilidade genética. Lopera Barrero et al. (2008) analisaram dois estoques de *Prochilodus lineatus*, e também encontraram valores superiores para índice de Shannon (0,47 e 0,46) e percentagem de fragmentos polimórficos (83,12 e 81,82).

Por sua vez, Povh et al. (2008), ao analisarem um estoque de *Piaractus mesopotamicus*, observaram valores inferiores aos do presente trabalho, quanto ao índice de Shannon e percentagem de fragmentos polimórficos (0,29 e 56,53, respectivamente), e atribuíram esse resultado a um manejo inadequado dos reprodutores daqueles plantéis. Observou-se com os trabalhos citados que a maior parte da variação está dentro de cada população e não entre as populações, enfatizando os resultados obtidos para a população de *A. ocellatus*.

5.4 Similaridade genética

Para a análise de similaridade genética entre os indivíduos (O) dessa população de *Astronotus ocellatus* foram utilizados os dados de genotipagem e H_e , posteriormente gerados. A partir daí, contruiu-se um dendograma onde foram observados os seguintes agrupamentos (clados): (1) O-1, O-2, O-3, O-4, O-5 e O-6. (2) O-7, O-11, O-9, O-10, O-18, O-20 e O-21 (3) O-12, O-13, O-17, O-15, O-19, O-22, O-23, O-14, O-16 e O-30 (4) O-24, O-25, O-26, O-27. Esses quatro grupos apresentam uma similaridade genética de aproximadamente 82%, enquanto o O-29 agrupado em um quinto grupo (5), foi o indivíduo mais distante, não se inclui em nenhum dos agrupamentos citados, sua similaridade com os demais é mais baixa, de 66% (Figura 5).

Os indivíduos O-13 e O-17, do agrupamento 3, apresentam similaridade genética de aproximadamente 97%, o que indica um parentesco muito próximo

Apesar dos índices de diversidade genética terem sido considerados moderados dentro da população, a porcentagem de similaridade entre os indivíduos ainda é alta. Para os clados mencionados, a similaridade varia de 66% (5) a 85% (1 e 2). Essa variação é justificada, principalmente pela ausência de dados sobre os indivíduos fundadores da população (JACOMETO et al., 2010), suas origens e contribuições alélicas até chegar na população de *A. ocellatus* avaliadas neste estudo.

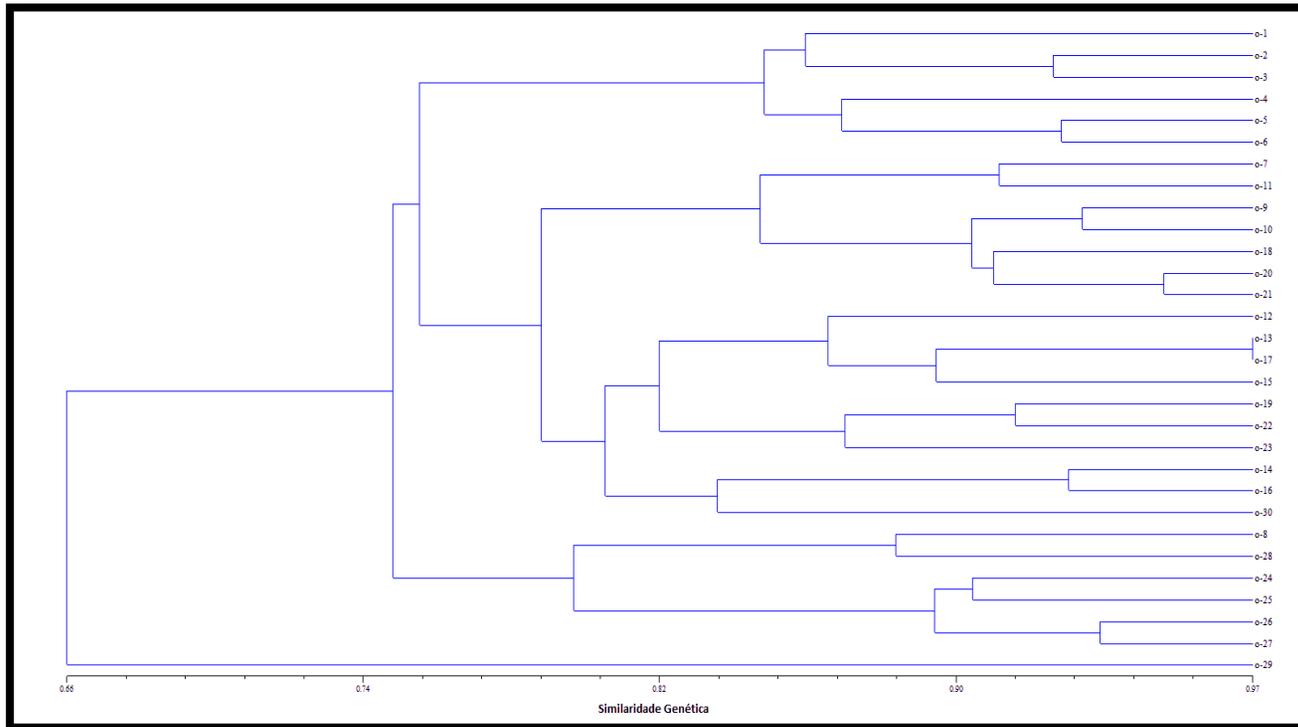


Figura 5 Dendrograma baseado na similaridade genética entre indivíduos (O) de uma população de *A. ocellatus*, utilizando o índice de Jaccard

6 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais adotadas para este estudo, não foi possível a identificação do sexo em *Astronotus ocellatus* pela sexagem manual nem pelo método molecular (ISSR). A sexagem manual é uma técnica subjetiva com altas taxas de equívocos o que a torna, na prática, inviável principalmente pelo risco de perdas na produção. Quanto ao ISSR, apesar da determinação de primers funcionais para a espécie, não foi possível a observação de padrão de bandas diferencial entre os sexos.

Os dados de diversidade genética para avaliados nesta população de *Astronotus ocellatus* (He, I e PL) indicaram moderada diversidade, diferente do esperado para populações em cativeiro. Essas informações sobre a população são de extrema importância, principalmente para estudos de conservação da espécie e para o traçado de novas estratégias para a manutenção e aumento da variabilidade da mesma.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, conseguimos observar que nem sempre em uma população em cativeiro encontram-se baixos índices de diversidade. Para justificativa de resultados como este, dados do histórico da população são de extrema importância, como, por exemplo, dados da idade da população, do fluxo gênico, do número de indivíduos formadores e também os dados diversidade como os apresentados aqui, porém em pisciculturas comerciais nem sempre se tem o controle disso, o que gera grandes preocupações para programas de conservação de espécies.

Sobre a identificação do sexo, não foi atingida a distinção pelas técnicas utilizadas no presente estudo. Como perspectivas para o alcance dessa distinção dos sexos, propõem-se a validação e utilização de um maior número de primers que possam gerar o padrão de bandas diferencial ou até mesma a implantação de outras técnicas de marcação molecular como AFLP e microsatélites.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. O. B.; LEBOUTE, E. M. Método para a sexagem visual de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). In: ENCONTRO RIOGRANDENSE DE TÉCNICOS EM AQUICULTURA, 4., 1993, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1993. p. 100-103.

ALLENDORF, E. W.; RYMAN, N. Genetic management of hatchery stocks. In: RYMAN, N.; UTTER, F. (Ed.). **Population genetics and fishery management**. Seattle: University of Washington, 1987. p. 141-159.

ANDRADE, D. R. et al. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue and Cell**, Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 524-532, 2001.

AQUA HOBBY. *Astronotus ocellatus*. Disponível em: <http://www.aquahobby.com/gallery/b_oscaro.php>. Acesso em: 29 jul. 2015.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, J. A.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 3, p. 283-301, Nov. 2001.

BRISCOE, D. A. et al. Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. **Conservation Biology**, Boston, v. 6, n. 3, p. 416-425, Sept. 1992.

BRUNELLI, J. P.; STEELE, C. A.; THORGAARD, G. H. Deep divergence and apparent sex-biased dispersal revealed by a Y-linked marker in rainbow trout. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 56, n. 3, p. 983-990, May 2010.

CARRILLO, M. A. **Indução à tetraploidia em tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus* utilizando-se choque térmico.** 2004. 56 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CAVERS, S. et al. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, Cary, v. 95, p. 281-289, July 2005.

CHEN, J. et al. A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio*. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 23, n. 5, p. 235-239, Oct. 2009a.

CHEN, Q. et al. Analysis of genetic variation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from native and colonized regions using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 549-555, 2009b.

CHIU, T. H. et al. Molecular markers for detection and diagnosis of the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). **Food Control**, Guildford, v. 24, n. 1/2, p. 29-37, 2012.

CULLEY, T. M.; WOLFE, A. D. Populations genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens*, as indicated by isozyme and ISSR molecular markers. **Heredity**, Washington, v. 86, n. 5, p. 545-556, Sept. 2001.

DESPREZ, D. et al. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11 - hydroxyandrostenedione (11 OHA4), in Florida red tilapia. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 216, n. 1/4, p. 55-65, Feb. 2003.

DEVLIN, R. H.; BIAGI, C. A.; SMAILUS, D. E. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. **Genetica**, Austin, v. 111, n. 1/3, p. 43-58, 2001.

DUARTE, J. F. **Conservação Genética de *Ficus bonijesulapensis* R.M. Castro em florestas decíduais sobre afloramentos calcários.** 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

FANG, X. Y. et al. RAPD and ISSR analysis on genetic diversity for wild and cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Oceanology and Limnology**, Qingdao, v. 2, p. 138-142, 2006.

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Ed.). **Fish adaptations**. New Delhi: Science, 2003. p. 285-308.

FELIP, A. et al. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, n. 1/4, p. 35-43, June 2005.

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

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro: aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.

FONTENELE, O.; NEPOMUCENO, F. H. Exame dos resultados da introdução do *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1849), em açudes do Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico do DNOCS**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 85-99, 1983.

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

GASMI, S. et al. Genetic diversity among the *Eurytemora affinis* species complex in the Scheldt estuary and its tributaries using ISSR-PCR marker assay. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 145, p. 22-30, May 2014.

GE, X. J. et al. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 5, p. 843-851, Feb. 2005.

GURGEL, J. J. S.; FREITAS, J. V. F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v. 31, n. 1, p. 37-44, 1973.

HOLSINGER, K. E. et al. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 11, n. 7, p. 1157-1164, 2002.

JACOMETO, C. B. et al. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 481-487, maio 2010.

KOCHER, T. D. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. **Nature**, London, v. 5, n. 5, p. 288-298, Apr. 2004.

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. A molecular approach the study of genic heterozygosity in natural populations: II amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, Austin, v. 54, p. 595-609, 1966.

LIU, Z. J.; CORDESB, F. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1/4, p. 1-37, Sept. 2004.

LOPERA BARRERO, N. M. et al. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 4, p. 86-93, dez. 2008.

LOPERA BARRERO, N. M. et al. Diversidad genética de *Piaractus mesopotamicus* utilizado em programas de repoblación. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 59, n. 225, p. 51-62, mar. 2010.

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

MALTAGLIATI, F. et al. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 626-634, 2006.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **IPEF**, Piracicaba, n. 35, p. 71-78, 1987.

MAZZUCHELLI, J. **Identificação e caracterização de sequências repetidas de DNA no genoma do ciclídeo *Astronotus ocellatus***. 2008. 66 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

NASCIMENTO, M. A. et al. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n. 3, p. 586-590, 1978.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th ed. New York: J. Wiley, 2006. 624 p.

PAVANELLI, G. C. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: VALENTI, W. C. et al. (Ed.). **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ, 2000. p. 208-209.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 288-295, Mar. 2006.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia: research and development.** Auburn: Auburn University, 1996. 23 p.

POVH, J. A. et al. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 201-206, fev. 2008.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomi and multivariate analysis system version 2.11.** New York: Applied Biostatistics, 2000. 470 p.

ROLDAN-RUIZ, I. et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 125-134, Feb. 2000.

SAAD, Y. M. et al. Analysis of genetic signature for some *Plectropomus* species based on some dominant DNA markers. **Life Science Journal**, New York, v. 9, n. 4, p. 2370-2375, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 545 p.

SILVA, E. M. et al. Screening and characterization of sex-specific DNA fragments in the freshwater fish matrinchã, *Brycon amazonicus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 1487-1496, Oct. 2012.

VOLFF, J. N.; KONDO, M.; SCHARTL, M. MedakadmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. **Trends in Genetics**, London, v. 19, n. 4, p. 196-199, 2003.

WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, New Orleans, v. 21, n. 2, p. 325-343, 1981.

WANG, D. et al. Discovery of a male-biased mutant family and identification of a male-specific SCAR marker in gyno genetic gibel carp *Carassius auratus gibelio*. **Progress in Natural Science**, Bethesda, v. 19, n. 11, p. 1537-1544, Nov. 2009.

WANG, S.; HARD, J. J.; UTTER, F. Genetic variation and fitness in salmonids. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 3, n. 3, p. 331-333, 2002.

WANG, S. F. et al. The genetic structure of nature and reared groups of *Haplogynys nitens* by ISSR analysis. **Acta Oceanology**, Xiamen, v. 29, n. 4, p. 105-110, 2007.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B**, New York, v. 395, p. 134-144, Apr. 2005.

YAO-PING, L. V. et al. Analysis of genetic variation in selected generations of “Whole Red” pattern *Cyprinus carpio* var. color using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 44, n. 71, p. 243-249, 2012.

YAZBECK, G. M. **Genética populacional de peixes migratórios**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 22 p. Relatório técnico.

ZEIDEN, S. F. **Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro durante o ciclo reprodutivo anual**. 2000. 152 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

ZIETKIWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 1, p. 176-183, Mar. 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TABELA DE GENOTIPAGEM

Tabela 1. Genotipagem dos 30 indivíduos da espécie *Astronotus ocellatus* após amplificação com nove primers universais distintos (UBC807, UBC808, UBC810, UBC811, UBC822, UBC827, UBC840, John, Manny)

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
UBC807	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
UBC807	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
UBC807	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
UBC807	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
UBC807	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
UBC807	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	
UBC811	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	0	0	-1	0	0	0	1	0	1	
UBC811	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	0	-1	1	1	1	0	0	1	
UBC811	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	
UBC811	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	-1	1	1	0	1	-1	0	1	1	-1	0	0	1	1	0	1	
UBC811	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	
John	1	-1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
John	0	-1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
John	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
John	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
John	0	-1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
John	0	-1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
John	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
Manny	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0
Manny	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	-1	-1	-1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0
Manny	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1
Manny	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1
Manny	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	-1	1	1	-1	0	1
UBC808	0	1	1	1	-1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC808	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC808	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC808	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC808	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC808	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC810	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC810	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC810	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
UBC827	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	0	-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC827	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	0	-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC827	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UBC840	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
UBC840	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
UBC840	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
UBC840	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
UBC822	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
UBC822	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
UB8222	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
UBC822	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
UBC822	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	