

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU- IBB

Ana Danyelle Noitel Valim de Arruda Paes

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DAS ESPÉCIES MATRINXÃ
(*Brycon amazonicus*), PIRAPUTANGA (*Brycon hilarii*) E SUA GERAÇÃO
FILIAL, UTILIZADOS NA PISCICULTURA BRASILEIRA.**

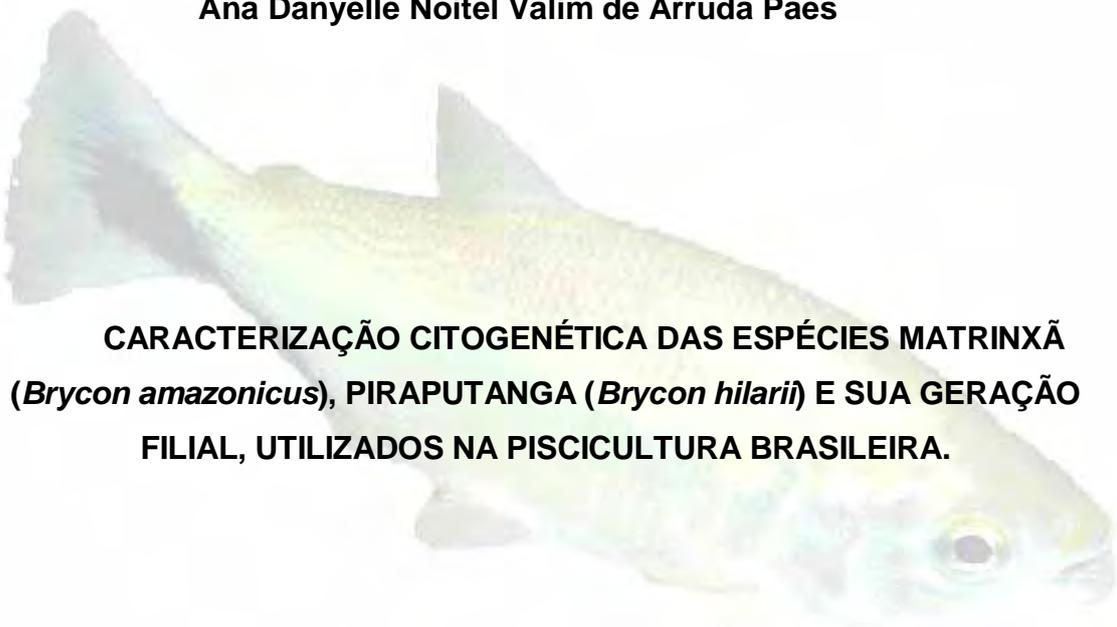
Botucatu – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU– IBB

Ana Danyelle Noitel Valim de Arruda Paes



**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DAS ESPÉCIES MATRINXÃ
(*Brycon amazonicus*), PIRAPUTANGA (*Brycon hilarii*) E SUA GERAÇÃO
FILIAL, UTILIZADOS NA PISCICULTURA BRASILEIRA.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Porto-Foresti

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Paes, Ana Danyelle Noitel Valim de Arruda.

Caracterização citogenética das espécies matrinxã (*Brycon amazonicus*),
piraputanga (*Brycon hilarii*) e sua geração filial, utilizados na piscicultura
Brasileira / Ana Danyelle Noitel Valim de Arruda Paes. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, 2011

Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti

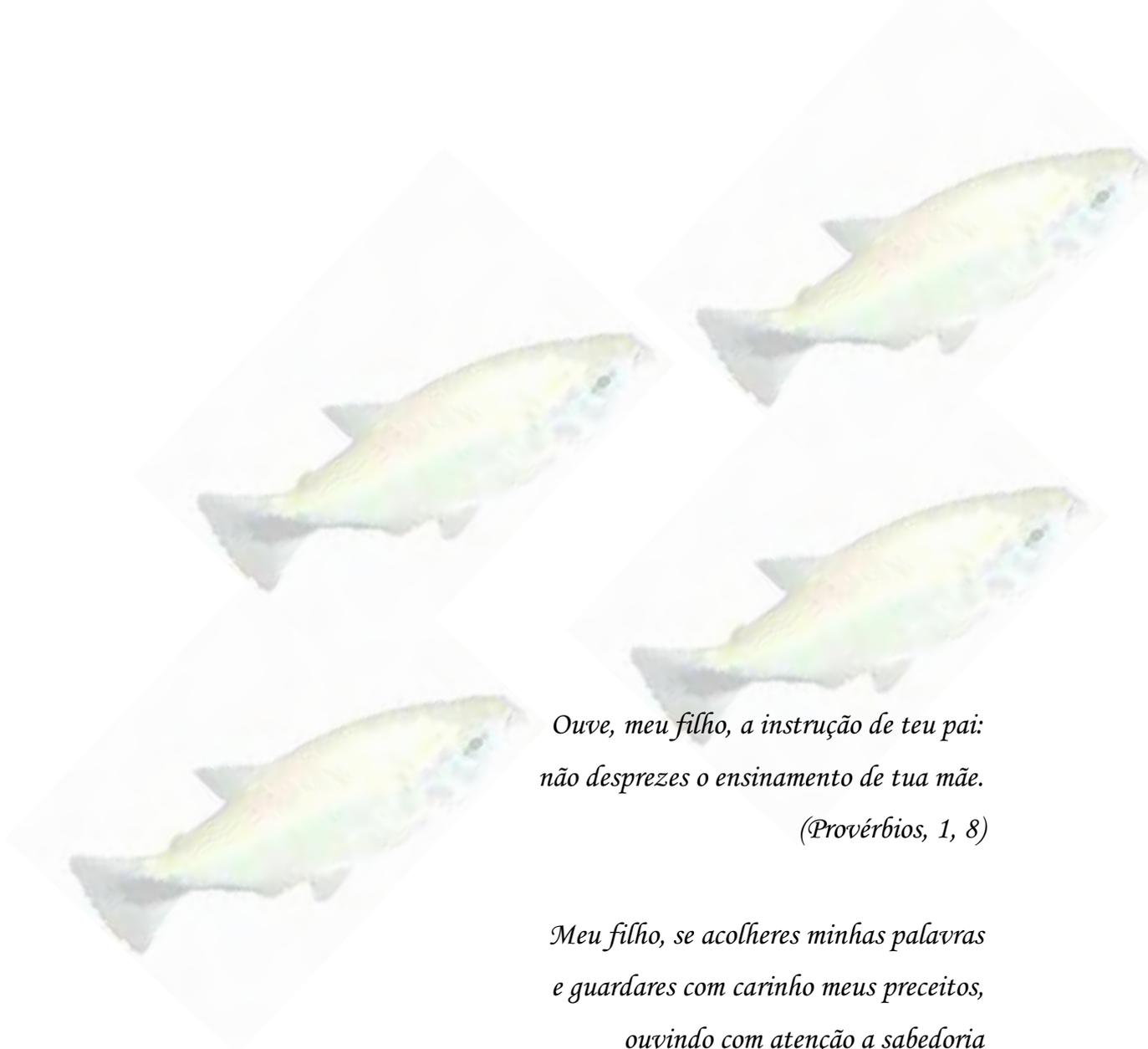
Capes: 20204000

1. Genética animal. 2. Brycon. 3. Peixe - genética.

Palavras-chave: Ginogênese; Híbridação interespecífica; Vigor híbrido.

Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru





*Ouve, meu filho, a instrução de teu pai:
não desprezes o ensinamento de tua mãe.*

(Provérbios, 1, 8)

*Meu filho, se acolheres minhas palavras
e guardares com carinho meus preceitos,
ouvindo com atenção a sabedoria
e inclinando teu coração para o entendimento;
se tu apelares à penetração,
se invocares a inteligência,
buscando-a como se procura a prata;
se a pesquisares como um tesouro,
então compreenderás o temor ao Senhor,
e descobrirás o conhecimento de Deus,
porque o Senhor é quem dá a sabedoria,
e de sua boca é que procedem a ciência e a prudência.*

(Provérbios, 2, 1-6)

*Aos meus queridos pais, Ana e Sérgio, pelo apoio
incondicional em todas as etapas até hoje vividas;*

*Ao meu marido, Sérgio,
pelo seu amor, carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Às instituições educacionais, à Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, campus de Bauru e ao Departamento de Ciências Biológicas, pela oportunidade da Graduação em Ciências Biológicas; ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – AC. Zoologia, à Seção de Pós-Graduação do Instituto e ao Departamento de Morfologia, pelo cordial apoio e oportunidade do prosseguimento de meus estudos. Ao centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, CEPTA/ICMbio e à Piscicultura XV de Novembro, pela grandiosa colaboração.

Ao Professor Fábio Porto-Foresti, pela oportunidade oferecida desde a Iniciação Científica, pela orientação, pelo apoio, incentivo e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Jehud Bortolozzi, pelo alegre convívio, carinhosa atenção e, principalmente pelos valiosos ensinamentos como mestre e amigo durante estes anos convivência.

Ao pesquisador José Senhorini pelo trabalho realizado junto ao CEPTA/ICMbio o qual foi de fundamental importância na concretização desta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) da UNESP-Bauru: Daniela, Fernanda, Rosângela, Caroline, Diogo, Sandro e Manolo, pela harmoniosa convivência e pela amizade.

À grande amiga Tatiana Ap. Voltolin, pelos ensinamentos, pela convivência, paciência, dedicação e acima de tudo compreensão, os quais foram essenciais para meu aprendizado e para a finalização de meu Mestrado.

Aos docentes e servidores do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP de Bauru e do Departamento de Morfologia da UNESP de Botucatu, pela atenção sempre dispensada.

OBRIÇADA A TODOS!

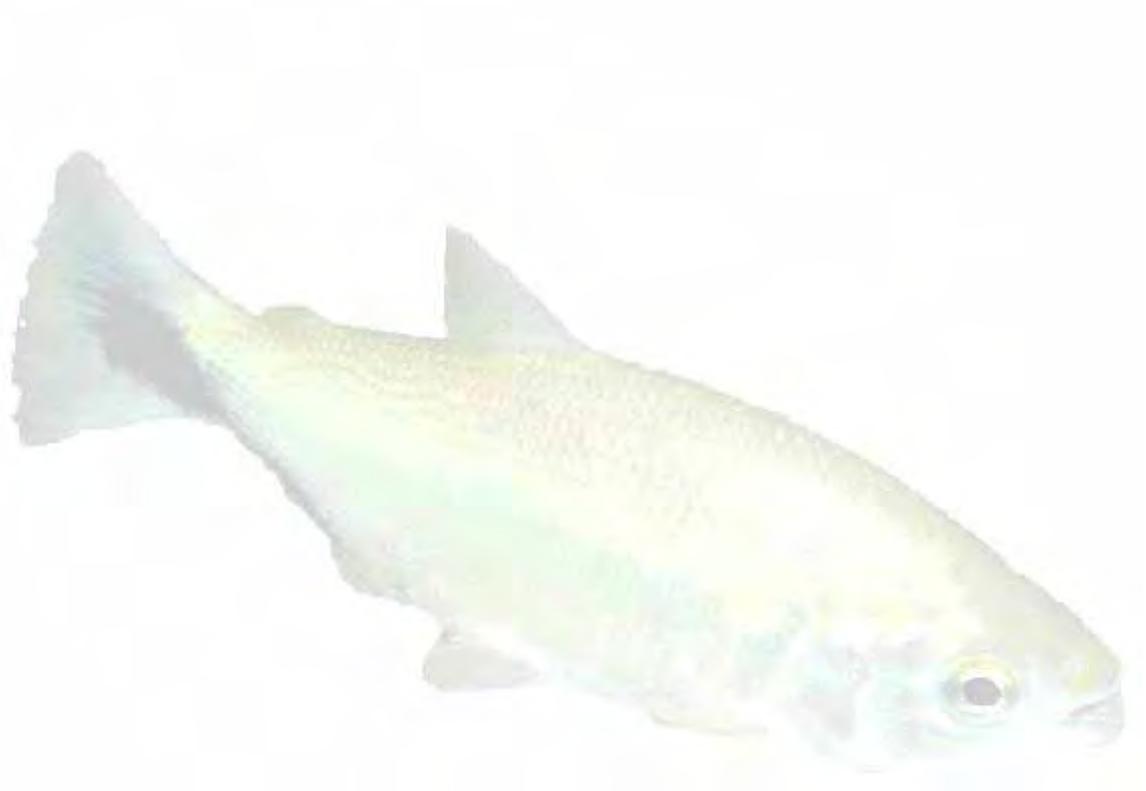
RESUMO

A hibridação interespecífica é considerada por diversos autores um método de melhoramento genético de difícil compreensão, uma vez que os produtos obtidos do acasalamento de diferentes espécies podem originar diversos produtos genéticos tais como Ginogenéticos e Androgenéticos Haplóides ou Diplóides, Híbridos Diplóides simples, Triplóides ou até indivíduos Tetraplóides. A aplicação da hibridação Interespecífica é utilizada no sistema de manejo nas grandes Pisciculturas que visa produzir animais que possuam melhor desempenho que as espécies parentais (vigor híbrido), como o aumento da taxa de crescimento, melhor qualidade da carne, resistência a doenças e capacidade de tolerar variações ambientais, além do aperfeiçoamento de diversas outras características a fim produzir peixes mais proveitosos para o cultivo. Dentre aproximadamente 40 espécies de peixes de interesse comercial no Brasil, destaca-se o gênero *Brycon*, de grande interesse nos centros de Pisciculturas devido à qualidade da carne, ao hábito alimentar, ao rápido crescimento e ganho de peso. Com o objetivo de compreender o mecanismo de hibridação, foram analisados 10 exemplares de cada espécie parental *B.amazonicus* (Matrinxã) e *B.hilarii* (Piraputanga) e 10 exemplares da respectiva geração Filial. Através da técnica de coloração com Giemsa, observou-se um conjunto diplóide $2n = 50$ cromossomos em todos os indivíduos analisados das espécies parentais e da geração Filial. No entanto, houve diferenciação na formação cariotípica dos parentais e da geração filial. O parental Matrinxã (*B.amazonicus*) e sua geração Filial apresentaram uma constituição cariotípica de seis cromossomos do tipo metacêntrico, nove cromossomos submetacêntrico e dez cromossomos subtelocêntrico, enquanto

que o parental Piraputanga (*B.hilarii*) apresentou uma constituição cariotípica de dez pares de cromossomos do tipo metacêntrico, nove pares de cromossomos submetacêntrico e seis pares de cromossomos subtelocêntrico. A detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos obtida pela técnica de impregnação pelo nitrato de Prata (Ag-RONs) demonstrou marcações na região telomérica de um par de cromossomo subtelocêntricos em todos os indivíduos analisados, tanto para as espécies parentais como na geração Filial. A análise das regiões ricas em heterocromatina constitutiva, por meio da técnica de bandamento C demonstrou que *B.amazonicus* e a geração Filial apresentam 11 pares de cromossomos com regiões banda C positivas, enquanto que *B.hilarii* apresenta 10 pares cromossômicos com marcações positivas para a heterocromatina constitutiva. A utilização da coloração com DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) em todas as espécies parentais e sua respectiva geração Filial demonstrou as regiões cromossômicas ricas em A-T, possivelmente coincidentes com as regiões portadoras da heterocromatina constitutiva. A aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sonda fluorescente (FISH) para o gene ribossômico 18S sinalizou nas espécies parentais e na geração Filial, regiões cromossômicas coincidentes com as regiões formadoras de nucléolos, dado também demonstrado pela utilização das técnicas de fluorocromos (CMA₃), enquanto que a hibridação *in situ* com sonda fluorescente para o DNAr 5S demonstrou diferentes resultados para os indivíduos analisados. Diante dos dados apresentados nesse trabalho, pode-se concluir que a geração Filial apresentou diversas características semelhantes ao parental *B.amazonicus* e bem distintas quando comparado com o parental

B. hilarii, sendo assim sugerido que a geração Filial é produto da ocorrência de ginogênese, uma forma de herança inteiramente materna.

Palavras chave: Ginogênese; Hibridação interespecífica; Vigor híbrido.



ABSTRACT

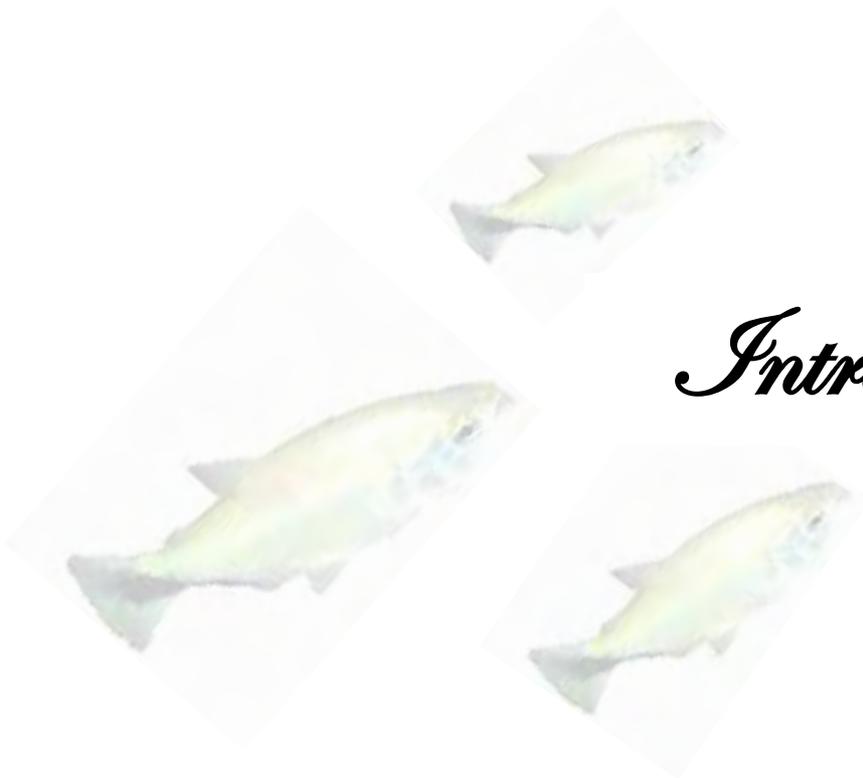
Interspecific hybridization is considered by many authors as a method of breeding that is difficult to understand, since the mating products obtained from different species can cause many genetic products, such as gynogenetic and androgenetic haploid or diploid, diploid hybrid simple, triploid or even individuals tetraploids. The application of Interspecific hybridization is used in the management system in major fisheries that aims to produce animals that have better performance than the parental species (hybrid vigor), as increased growth rate, meat quality, disease resistance and ability to tolerate environmental changes besides the improvement of several other characteristics in order to produce more profitable fish farming. Out of approximately 40 fish species of commercial interest in Brazil, there is the genus *Brycon*, of great interest in the centers of fish farms due to meat quality, the feeding habits of the rapid growth and weight gain. Aiming to understand the mechanism of hybridization, we analyzed 10 specimens of each parental species *B. amazonicus* (Matrinxã) and *B. hilarii* (Piraputanga) and 10 of filial generation. By staining with Giemsa, all specimens analyzed have a number diploid with $2n = 50$ chromosomes. However, there was karyotypic differentiation in the formation of parental and filial generation. The parental Matrinxã (*B. amazonicus*) and his generation branch had a karyotype constitution of six chromosomes of metacentric type, nine submetacentric chromosomes and ten subtelocêntric chromosomes, while the parental Piraputanga (*B. hilarii*) showed a karyotype constitution of ten pairs of chromosomes metacentric, nine pairs of chromosomes submetacentric and six subtelocentric chromosomes pairs. The detection of Nucleolar Organizer

Regions (RONs) was obtained by the technique of impregnation by silver nitrate (Ag-NORs) that showed markings on the telomeric region of a subtelocentric chromosome pair for both parental species and in generating branch. The analysis of regions rich in heterochromatin constitutive, by C banding technique, demonstrated that the generation Filial and the parental species *B.amazonicus* have 11 pairs of chromosomes with C-band positive regions, whereas *B.hilarii* presents 10 chromosomes with markers positive for the heterochromatin constitutive. The use of staining with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) in all the parental species and their respective generation branch showed the chromosomal regions rich in AT, possibly coinciding with the regions bearing the constitutive heterochromatin. The application of the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with a specific 18S ribosomal gene, indicated in the parental species and the generation Filial, chromosomal regions coincident with the nucleolar-forming regions, as also demonstrated by using the techniques of fluorochromes (CMA₃), whereas in fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with a specific 5S rDNA showed different results for the all individuals. Before the presented data here, we can conclude, that the generation branch had many characteristics equal to their parental *B.amazonicus* and distinct characteristics when compared with their parental *B.hilarii*, suggesting that generating branch is a product gynogenetic, a form of complete maternal inheritance.

Keywords: Ginogênese; Interspecific hybridization; hybrid vigor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	2
1.1 Histórico da Aquicultura	2
1.2 A Piscicultura no Brasil.....	3
1.3 Introduções de espécies exóticas	5
1.3.1 Aspectos Gerais.....	7
1.3.2 Sob o ponto de vista genético	8
1.3.3 Hibridação interespecífica	9
1.3.4 Ginogênese.....	14
1.3.5 Usos de metodologias na identificação de híbridos interespecíficos ..	14
1.3.6 Análises citogenéticas.....	16
1.4 Características da família Characidae e da subfamília Bryconinae	17
1.5 Características do gênero <i>Brycon</i>	19
1.5.1 Caracterização das espécies parentais.....	20
1.5.2 Características citogenéticas das espécies parentais	22
1.6 Objetivos	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Materiais	26
2.2. Métodos.....	29
2.2.1 Estimulação de mitoses	29
2.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos de peixes (técnica <i>in vivo</i>)	30
2.2.3 Detecção da região organizadora de nucléolo (Ag-NOR).....	31
2.2.4 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda C)	32
2.2.5 Bandamento com o fluorocromo Cromomicina A ₃ (CMA ₃)	33
2.2.6 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sondas de DNAr	33
<i>Obtenção das sondas</i>	33
<i>Marcação do DNA pela técnica de nick translation</i>	34
<i>Hibridação</i>	35
2.2.7 Estudos Cariotípicos.....	37
2.2.8 Montagem dos Cariótipos	37
3 RESULTADOS	39
4 DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÃO	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67



Introdução

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Histórico da Aquicultura

Ao longo da sua história, o homem tem utilizado mais intensivamente os rios do que qualquer outro tipo de sistemas naturais para sua subsistência (Arthington & Welcomme, 1995). Há registros históricos (documentos, manuscritos chineses e hieróglifos egípcios) que evidenciam um sistema de cultivo de organismos aquáticos que incluía, de forma simplificada, o armazenamento de exemplares imaturos de diversas espécies de peixes, macroalgas e outros organismos, seu desenvolvimento condicionado a um ambiente propício, que não demandava adição de muitos insumos ou recursos externos, e por fim seu consumo pelas populações, sendo uma importante fonte alimentar (C Oliveira, 2009). Sabe-se que o cultivo controlado ou semi-controlado de diversos organismos pelo homem é uma atividade que teve início na China, há aproximadamente 4.000 anos, com o monocultivo de peixes, inicialmente com a carpa comum, *Cyprinus carpio*, e posteriormente com outras espécies de peixes, além das macroalgas, fazendo da China o berço da Aquicultura (Camargo & Pouey, 2005), ou seja, uma atividade que se refere ao cultivo de diversos organismos aquáticos, incluídos neste contexto plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, sendo que a intervenção ou manejo do processo de criação é imprescindível para o aumento da produção todas as formas de cultivo de organismos aquáticos, sendo estes animais e vegetais (C Oliveira, 2009).

No início da década de 50, a produção aquícola (excluindo as plantas aquáticas) contava com menos de um milhão de toneladas por ano, quando em 2008, passou para 52,5 milhões de toneladas, representando a partir de 1970, significativo crescimento médio anual de cerca de 8,0% (FAO, 2010).

Atualmente, a China é o maior produtor aquícola mundial, produzindo 47,5 toneladas (32,7 e 14,8 milhões de toneladas de aquicultura e pesca de captura, respectivamente), onde a produção global pesqueira foi de 90 milhões de toneladas, e é responsável por 62% da produção global em termos de quantidade de 51% em termos de valor (FAO, 2010).

Devido ao fato de os peixes constituírem o principal grupo de organismos cultivados, totalizando cerca de 80% da produção mundial (Camargo & Pouey, 2005), uma ramificação da Aquicultura foi criada para tratar exclusivamente de programas voltados para o cultivo e manejo destes, ou seja, a Piscicultura (produção e reprodução de peixes em ambiente controlado) (Avault, 1996; McLarney, 1984, Ceccarelli et al., 2000).

1.2 A Piscicultura no Brasil

No Brasil, a piscicultura como atividade, é recente quando comparada com a da China ou da Europa, pois as primeiras ações realizadas foram feitas por Maurício de Nassau, em 1637 com a construção de viveiros em áreas estuarinas situadas próximas a sua residência (Silva, 2005).

No século XIX, uma das primeiras espécies não nativa introduzidas foi a espécie *Cyprinus carpio*, introduzida com o objetivo de sustentar os imigrantes alemães no estado de Santa Catarina (Silva, 2005). Posteriormente, em 1904,

o Estado de São Paulo iniciou a importação da mesma espécie dos EUA, com a finalidade de difundir a prática da piscicultura (Makinouchi, 1980; Nomura, 1982; Stempniewski, 1997).

Porém, o ápice da piscicultura no Brasil ocorreu com as publicações científicas do pesquisador brasileiro Rodolpho Von Ihering, o qual trabalhou com diversas espécies brasileiras tais como: Curimatá (*Prochilodus lineatus*), Dourado (*Salminus maxillosus* espécie sinônimo de *Salminus brasiliensis*), Piracanjuba (*Brycon lundii* espécie sinônimo de *Brycon orbignyanus*), Mandi (*Pimelodus maculatus*) e outras, objetivando viabilizá-las para o desenvolvimento da piscicultura nacional (Godoy, 1964). Rodolpho Von Ihering foi também responsável pelos estudos com peixes na Região Nordeste brasileira, quando em 1933, no Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) iniciou diversos projetos de desova induzida de espécies nativas do rio São Francisco. Ainda nessa época, as construções dos açudes tinham como objetivo a minimização dos efeitos da seca regional e a criação de peixes (Proença & Bittencourt, 1994).

Rodolpho Von Ihering fez parte do primeiro grande centro de estudos, pioneiro no Brasil, denominado Estação Experimental de Biologia e Piscicultura de Pirassununga, que se dedicou em desenvolver pesquisas em cinco áreas: ambiente, pesca e biologia de peixes, dinâmica de populações e piscicultura. A partir de 1942, o povoamento de açudes do Brasil passou a não mais ser feito através de espécimes capturados dos rios e sim a partir de estações de pisciculturas para produção de alevinos (Gurgel, 1981).

Somente em 1950, a Piscicultura com fins comerciais no Brasil foi introduzida, com a importação e produção de espécies exóticas tais como

tilápia, carpa e truta que começaram a ser cultivadas em tanques de pequenas propriedades (FAO, 2006). Nos anos subsequentes, expandiu-se a pesca esportiva em tanques, os “pesque e pague”, que em sua grande maioria localizavam-se nas periferias das grandes cidades que incentivaram a produção de alevinos e jovens espécimes que, posteriormente, eram transferidos aos tanques de produção. (Aguirre et al., 1989).

De acordo com Welcomme (1988), devido às atividades de piscicultura, 1.354 peixes exóticos, pertencentes a 237 espécies foram inseridas em 104 países que além do impacto financeiro positivo para a prática da Piscicultura, causaram alguns impactos como degradação ambiental, predação, retardamento da evolução natural das espécies, degradação genética, introdução de doenças, além dos efeitos socioeconômicos.

1.3 Introduções de espécies exóticas

O ser humano introduz espécies há pelo menos 10.000 anos (Perry & Vanderklein, 1996), e, desde o início da expansão européia, as introduções deliberadas ou acidentais vêm aumentando em grande escala (Coblentz, 1990). De acordo com a FAO (1997), as principais espécies introduzidas no Brasil, visadas principalmente para a piscicultura foram: *Cyprinus carpio* (carpa comum, em 1898); *Micropterus salmoides* (“black bass”, por volta de 1920); *Tilapia rendalli* (tilápia, em 1953); *Oreochromis mossambicus* (tilápia, no período 1960-1970); *Ictalurus punctatus* (bagre-de-canal, ou bagre-americano, em 1971); *Oreochromis niloticus* (tilápia, em 1972); *Ctenopharyngodon idella* (carpa-espelho, em 1983); *Hypophthalmichthys molitrix* (carpa-prateada, em 1983); *Hypophthalmichthys nobilis* (carpa-cabeçuda, em 1984); *Clarias*

gariepinus (bagre-africano, em 1986), as quais hoje, devido a ações antrópicas, habitam a maioria as bacias hidrográficas brasileiras e na maioria das vezes causam prejuízos, pois podem provocar ou ao menos contribuir para a extinção da flora e fauna nativa pela hibridação (mistura de conjuntos gênicos de espécies diferentes, cujo resultado final pode ser um indivíduo com características intermediárias) (Senhorini et al., 2009 *apud* Ashikaga et al., 2010) e introgressão (fluxo gênico existente entre as espécies de populações hibridadas) (Allendorf et al., 2001).

Estes processos podem ser mais notórios em se tratando de espécies raras quando em contato com outras mais abundantes (Rhymer & Simberloff, 1996). É interessante notar, que o processo natural de hibridação não constitui uma ameaça na conservação de espécies, sendo ela parte de suas histórias evolutivas (Trigo, 2008), mas para isso, é preciso controle genético e biológico para as espécies introduzidas e nativas.

Dados descritos na literatura, como o FISHBASE (<http://www.fishbase.org>; Froese & Pauly, 2007), demonstram que atualmente existem 3.072 registros de introduções de peixes entre países, e destes, 2.904 são de espécies de água doce (Casal, 2006; Froese & Pauly, 2007; Vitule et al., 2009). Dentre os dados descritos das introduções de peixes em ecossistemas aquáticos continentais brasileiros, a piscicultura é a principal atividade responsável e dispersora (Orsi & Agostinho, 1999; Vitule et al., 2006 A,B; Agostinho et al., 2007; Vitule et al., 2009).

1.3.1 Aspectos Gerais

A crescente demanda pelo crescimento das pisciculturas a partir de 1950, uma vez que a atividade passou a ter fins comerciais e não mais de subsistência, houve diversas introduções de espécies não nativas nas bacias hidrográficas brasileiras e também mundiais. Esta ação antrópica, é considerada uma das grandes ameaças à biodiversidade do planeta (Vitousek, 1997; Neville & Murphy, 2001) e um dos principais problemas para conservação de peixes de água doce (Cowx, 2002; Cambray, 2003; Collares-Pereira & Cowx, 2004; Gherardi, 2007; Leprieur et al., 2008).

De acordo com a European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC), os termos: espécie introduzida, espécie exótica, espécie alienígena, espécie não nativa, espécie não indígena e espécie alóctone, possuem o mesmo significado biológico e correspondem em “toda e qualquer espécie transportada e solta pelo homem, fora de sua área de distribuição natural, intencional ou acidentalmente” (FAO, 2006).

Dentro de um contexto biológico, mas principalmente financeiro, a partir dos anos 80, as abordagens genéticas passaram a contribuir de maneira efetiva nos programas de criação de peixes (Foresti, 2000; Hulata, 2001). Com o emprego de técnicas clássicas e modernas, passou a ser possível a manipulação cromossômica e a obtenção de linhagens que apresentem vantagens para a comercialização (Toledo-Filho et al., 1996; Porto-Foresti & Foresti, 2004). No entanto, o principal objetivo genético dos programas de manejo e monitoramento tem sido em última análise contribuir para a conservação do potencial biológico de populações selvagens de peixes, cujo habitat tenha sido alterado, e que corram, portanto, risco de redução ou até

mesmo extinção (Toledo-Filho et al., 1992). A perda da variabilidade genética dos estoques nas pisciculturas utilizados em programas de repovoamento, em razão do inadequado manejo genético, descrito por Frost et. al. (2006) como um problema que leva à endogamia, diminui a adaptabilidade e a sobrevivência das progênes que serão liberadas (Povh, 2007).

1.3.2 Sob o ponto de vista genético

De acordo com Povh et al. (2008), em geral, as análises genéticas de estoques de pisciculturas representam informações de grande importância para conseguir ganhos expressivos na produção e na conservação de peixes. Segundo Toledo-Filho et al. (1992, 1994, 1996), a genética aplicada à piscicultura abrange as quatro principais áreas que estão intimamente interligadas: manipulação, manejo, monitoramento e conservação genética.

Sabe-se que o principal foco do melhoramento genético aplicado a aquicultura é voltado para o aumento na taxa de crescimento dos peixes em curto espaço de tempo (Kang et al., 2002), sabendo-se que o principal benefício do melhoramento genético para taxa de crescimento é a redução dos custos fixos e custos de produção, devido ao menor requerimento para a manutenção. No entanto, este melhoramento genético deve ser dirigido, pois, com base em uma grande variabilidade genética inicial pode-se assegurar a existência de variabilidade suficiente para se alcançar as melhorias desejadas para sucessivas gerações (Resende, 2008).

Atualmente, a maioria das linhagens de peixes geneticamente melhoradas que alcançam a indústria da aquicultura foram desenvolvidas

através de métodos tradicionais de manipulação genética, que incluem seleção, hibridação e endogamia (Hulata, 2001).

No entanto, por falta de tecnologias, muitos produtores têm optado pela hibridação de espécies, tentando ganhos maiores, sem estudo prévio e conseqüentemente os ganhos aparentes não se mostram permanentes, pois há necessidade constante de efetuar essas hibridações para a preservação da qualidade genética, além das possíveis ameaças ambientais desconhecidas, na medida em que muitos desses híbridos e suas proles vêm se mostrando férteis e, ao escaparem para a natureza, podem provocar acidentes genéticos incalculáveis (Resende, 2008).

Entre as metodologias clássicas de cruzamento, a hibridização interespecífica constitui um dos métodos mais utilizados nas pisciculturas mundiais e brasileiras, cujos resultados, no entanto, são de interpretação difícil e detalhada (Toledo-Filho et al., 1994).

1.3.3 Hibridação interespecífica

Os estudos de hibridação em peixes iniciaram-se ao final do século dezenove e tiveram notoriedade a partir de 1919 (Chevassus, 1983), quando o pesquisador Hubbs, evidenciou que o cruzamento entre espécies de peixes de água doce era muito mais frequente (Hubbs, 1955) quando o mesmo evento era comparado com outros grupos de vertebrados. Concomitantemente, o uso de programas de hibridação em piscicultura tem sido utilizado em inúmeras espécies de peixes a fim de produzir animais estéreis e que possuam melhor desempenho que as espécies parentais (vigor híbrido), como o aumento da taxa de crescimento, melhor qualidade da carne, resistência a doenças e

capacidade de tolerar variações ambientais, além do aperfeiçoamento de diversas outras características a fim produzir peixes mais proveitosos para o cultivo (Bartley et al., 2001).

No Brasil, que abriga a biota mais diversa entre os 17 países megadiversos do planeta (Torres et al., 2004), que possui a fauna de peixes de água doce mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies, ou seja, 22% das espécies de peixes de água doce existindo ainda muitas desconhecidas (Buckup & Menezes, 2003; Buckup et al., 2007), abrangendo o contexto social de que o crescimento populacional e a demanda mundial por proteína animal favorecem a piscicultura como atividade agropecuária promissora (Rodrigues et al., 2009) o uso da metodologia de hibridação artificial em peixes teve início há aproximadamente 35 anos envolvendo tilápias, no Departamento de Obras Contra a Seca (DNOCS) (Toledo-filho et al., 1998). Utilizando a mesma tecnologia, em 1985 o Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais (CEPTA - Pirassununga, SP) produziu o “Tambacu”, híbrido interespecífico entre fêmea de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e macho de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Bernardino et al., 1986). A partir de então, houve um crescente interesse pela aplicação desta metodologia e atualmente diversas espécies têm sido utilizadas com sucesso em programas com este objetivo, envolvendo “peixes redondos” como o pacu, tambaqui e pirapitinga, espécies do gênero *Leporinus* como o piauçu e a piapara, e grandes bagres siluriformes como o pintado, cachara, jandiá e pirarara (Godinho, 2007; Porto-Foresti et al., 2008). Portanto, torna-se necessário que programas efetivos de caracterização e monitoramento desses animais sejam postos em prática para

uma avaliação correta do uso desses indivíduos em projetos de piscicultura, evitando riscos para o meio ambiente.

O fenômeno da hibridação é definido como uma fusão de dois patrimônios genéticos diferentes, cujos produtos podem apresentar caracteres taxonômicos intermediários (Mayr, 1963). Ainda, segundo Bartley et al. (2001), a hibridação também pode ser conceituada como o cruzamento de grupos ou indivíduos geneticamente diferenciados, e pode envolver tanto cruzamentos entre linhagens dentro de uma mesma espécie quanto entre indivíduos de espécies diferentes.

Para muitos pesquisadores, o processo de hibridação natural é um fenômeno que tem um importante papel para a evolução dos organismos, pois este processo pode produzir genótipos que estabelecem novas linhagens evolutivas (Arnold & Hodges, 1995). Verifica-se que entre os peixes, a hibridação é um fenômeno bastante comum (Schwartz, 1981; Bartley et al., 2001; Scribner et al., 2001; Allendorf et al., 2001), quando comparado aos diversos grupos de vertebrados (Campton, 1987; Allendorf & Waples, 1996). No entanto, de acordo com Mayr (1963), a hibridação natural bem sucedida é um fenômeno raro. Isto ocorre pela própria condição ecofisiológica do grupo, que apresenta características peculiares como a fertilização externa, mecanismos de isolamento, competição por territórios de desova, abundância de espécies e sobrevivência em ambientes limitados (Hubbs, 1955; Campton, 1987). Entretanto, a hibridação natural é considerada um fenômeno com um importante papel para a evolução dos organismos, por possibilitar o surgimento de novos genótipos que poderiam estabelecer linhagens evolutivas, ou seja, a especiação (Arnold & Hodges, 1995).

Sabe-se que a maioria das hibridações em peixes no ambientes natural ocorre em águas continentais, onde a frequência de hibridação e especiação é notavelmente maior que em espécies de águas marinhas, a qual é considerada um evento muito mais raro (Hubbs, 1995). Além do mais, metade da ocorrência de eventos de hibridação em peixes tem sido atribuída à intervenção humana, como observado por Scribner et al. (2001), com as atividades de aquicultura sendo o principal fator, seguidas de introduções de espécies fora do seu local de origem e alterações ou perda de habitats. Sabe-se que de 163 eventos de hibridação verificados em espécies de peixes, 81 envolviam direta ou indiretamente influência humana, como a degradação do ambiente natural, o desenvolvimento da hibridação artificial em programas de aquicultura e a introdução de espécies não nativas no ambiente natural. Entre estas atividades, a aquicultura foi o fator que prevaleceu, correspondendo a 39% das causas de eventos de hibridação (Scribner et al., 2001). Considerando-se as inúmeras possibilidades de cruzamentos interespecíficos entre espécies de peixes neotropicais, a Tabela 1 descrita por Porto-Foresti et al. (2008), apresenta uma relação de cruzamentos já realizados ou possíveis de serem realizados, com indicação dos produtos híbridos.

Chevassus (1983), em trabalhos com indivíduos de populações naturais ou resultantes de cruzamentos artificiais entre espécies distintas de peixes, determinou que resultados genéticos diferentes de uma hibridação podem ocorrer, de acordo com a natureza e a ploidia das linhagens parentais. Esta problemática, posteriormente rediscutida por Toledo-Filho et al. (1994), propõe que o projeto de hibridação que utilizar como parentais fêmeas (FF) e machos (MM) diploides simples poderá produzir oito diferentes tipos genéticos,

identificados como ginogenéticos haploides (F) e diploides (FF), androgenéticos haploides (M) e diploides (MM), híbridos diploides simples (FM), triploides, que podem apresentar dois complementos cromossômicos do parental fêmea e um do macho (FFM), ou dois complementos do macho e um da fêmea (MMF) e tetraploides (FFMM).

Tabela 1. Relação de espécies de peixes e cruzamentos com possibilidade de aparecimento de híbridos, identificados pela natureza das linhagens parentais (Porto-Foresti et al., 2008).

GERAÇÕES PARENTAIS		PRODUTO HÍBRIDOS
Parental Feminino	Parental Masculino	
Tambaqui	Pacu	“Tambacu”
Colossoma macropomum	Piaractus mesopotamicus	
Pacu	Tambaqui	“Paqui”
Piaractus mesopotamicus	Colossoma macropomum	
Tambaqui	Pirapitinga	“Tambatinga”
Colossoma macropomum	Piaractus brachypomus	
Pirapitinga	Tambaqui	“Pirabaqui”
<i>Piaractus brachypomus</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	
Pacu	Pirapitinga	“Patinga”
Piaractus mesopotamicus	<i>Piaractus brachypomus</i>	
Pirapitinga	Pacu	“Pirapicu”
<i>Piaractus brachypomus</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	
Piauçu	Piapara	“Piaupara”
Leporinus macrocephalus	<i>Leporinus elongatus</i>	
Piapara	Piauçu	“Piapapi”
<i>Leporinus elongatus</i>	<i>Leporinus macrocephalus</i>	
Pintado	Cachara	“Pintaca”
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	
Cachara	Pintado	“Cachapin”
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	
Pintado	Jurupoca	“Pintajuru”
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Hemiosorubim platyrhynchus	
Pintado	Pirarara	“Pintapira”
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Phractocephalus hemioliopus	
Cachara	Pirarara	“Cachapira”
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Phractocephalus hemioliopus	
Carpa capim	Carpa cabeça-grande	“Híbrido”
Ctenopharyngodon idella	Aristichthy nobolis	
Carpa capim	Carpa comum	“Híbrido”
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Cyprinus carpio	
Carpa prateada	Carpa cabeça-grande	“Híbrido”
Hypophthalmichthys molitrix	<i>Aristichthy nobolis</i>	
Carpa cabeça-grande	Carpa prateada	“Híbrido”
<i>Aristichthy nobolis</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	
Tilápia do Nilo	Tilápia de Zanzibar	“Híbrido”
Oreochromis niloticus	<i>Oreochromis hornorum</i>	

1.3.4 Ginogênese

A ginogênese ou herança materna completa “é o processo de trazer à existência um ser somente a partir da fêmea” (Purdon, 1993), ou seja, uma forma de herança inteiramente materna que consiste na estimulação do desenvolvimento de um ovo por um espermatozóide geneticamente inativado (na maioria das vezes) e posterior diploidização pela retenção do 2º. corpúsculo polar, ou pelo bloqueio da primeira clivagem (Arai, 2001). Esse processo tem duas grandes aplicações potenciais em piscicultura: a primeira é no controle da proporção sexual pela produção de linhagens monosexo fêmeas, e a segunda é a rápida produção de linhagens altamente consanguíneas (Pinto Cesar et al., 2005).

Nos casos em que as fêmeas são homogaméticas na determinação sexual, como a truta arco-íris (Thorgaard, 1977), a ginogênese pode ser usada para a produção de populações monossexuadas femininas. Entretanto, os indivíduos ginogenéticos, por serem de herança exclusivamente materna, apresentam maior consanguinidade (Thorgaard, 1986). Além disso, a produção de ginogenéticos em escala comercial é ainda impraticável, devido à alta mortalidade resultante do tratamento (Tabata, 2008).

1.3.5 Usos de metodologias na identificação de híbridos interespecíficos

A caracterização e a identificação genética de estoques que sofreram manipulação genética é um procedimento bastante recomendável para as estações de piscicultura que utilizam essas técnicas para o melhoramento animal. O monitoramento genético de produtos resultantes de processos de

hibridação interespecífica consiste no uso de metodologias que possibilitem encontrar características diagnósticas que identifiquem, de maneira clara e acessível, parentais e híbridos (Toledo-Filho et al., 1994).

Para a identificação dos produtos híbridos, existem diversas metodologias propostas na literatura que podem ser aplicadas na busca de informações diagnósticas (Porto-Foresti et al., 2008; Porto-Foresti et al., 2010). Algumas dessas técnicas, muitas vezes são de difícil execução e custo elevado. Porém a grande maioria das metodologias envolve análises morfogenéticas; análises de marcadores citogenéticos, realizadas através de estudos de cariótipos e da aplicação de vários tipos de bandeamentos cromossômicos; uso de marcadores genético-bioquímicos, obtidos pela eletroforese de alozimas e isozimas; métodos genético-moleculares, com a análise de regiões específicas do DNA nuclear e mitocondrial (Toledo-Filho et al., 1994).

Avanços recentes em biotecnologia têm expandido o número de técnicas genéticas disponíveis para estudos que envolvam a hibridação, possibilitando uma identificação confiável de espécies parentais e linhagens híbridas produzidas em cativeiro e, em alguns casos, servindo como evidência da ocorrência de hibridação e introgressão genética em ambientes naturais (Padhi & Mandal, 1997; Ward, 2000; Scribner et al., 2001; Young et al., 2001; Hashimoto et al., 2009c).

1.3.6 Análises citogenéticas

Os métodos citogenéticos, além de serem considerados de baixo custo, constituem uma maneira bastante precisa de se verificar tanto os níveis de ploidia como a procedência dos complementos cromossômicos dos parentais nos produtos resultantes de hibridação interespecífica em peixes (Toledo-Filho et al., 1994).

Alguns casos descrevem apenas as diferenças cariotípicas entre o híbrido e seus parentais, devido à diferença na fórmula cariotípica e/ou número fundamental, como demonstrado no caso do híbrido Tilápia Vermelha (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis mossambicus*) (Manosroi et al., 2003).

Nos casos em que híbridos e parentais apresentam um número diploide igual e um cariótipo similar em número e morfologia, torna-se necessário o emprego de técnicas de colorações diferenciadas e bandeamentos cromossômicos, como bandas-C, NOR (Regiões Organizadoras de Nucléolos) e Hibridação *in situ* utilizando sondas cromossômicas específicas, na tentativa de encontrar um marcador que os diferencie (Porto-Foresti et al., 2008; Porto-Foresti et al., 2010). Tais recursos metodológicos permitiram a identificação dos parentais e dos híbridos obtidos dos cruzamentos entre pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Almeida-Toledo et al., 1987) e também na perfeita identificação dos parentais das espécies *Leporinus elongatus* e *Leporinus macrocephalus* e do híbrido “piaupara” obtido desses cruzamentos interespecíficos (Porto-Foresti et al., 2008).

Espécies de carpas *Aristichthys nobilis* e *Hypophthalmichthys molitrix* e seus híbridos interespecíficos apresentaram $2n=48$ cromossomos, sendo indistinguíveis através da coloração com Giemsa. Porém, marcações de banda

C possibilitaram a diferenciação entre os híbridos e parentais (Almeida-Toledo et al., 1995). Já os híbridos entre *Pleuronectes ferrugineus* e *P. americanus* foram identificados através da identificação de regiões satélites em seus cromossomos (regiões correspondentes às NORs), onde somente *P. americanus* possuía um par de acrocêntricos marcados e apenas um cromossomo foi identificado nos híbridos (Park et al., 2003).

Entretanto, em alguns casos, as análises citogenéticas não possibilitam a obtenção de marcadores cromossômicos que diferenciem híbridos interespecíficos das espécies parentais, como verificado por Brinn et al. (2004), o qual não conseguiu diferenciar duas espécies do gênero *Cichla* e seus híbridos F1, pois apresentaram o mesmo número diploide e morfologia cromossômica similar.

Portanto, o emprego de técnicas citogenéticas é uma etapa importante a ser realizada no estudo de híbridos de peixes, a fim de obter um conhecimento inicial sobre os cromossomos destes animais e na busca de marcadores que os identifiquem.

1.4 Características da família Characidae e da subfamília Bryconinae

A família Characidae compreende 55% dos peixes de água doce (Fink & Fink, 1981), em torno de 1.200 espécies (Reis et al., 2003) e é considerada a quarta mais diversa família de peixes (Eschmeyer & Fricke, 2009), compreendendo 12 subfamílias, 167 gêneros. Está inserida dentro da ordem dos Characiformes, a qual possui pelo menos 1800 espécies (Reis et al., 2003) e é composta por 18 famílias (Reis et al., 2003; Buckup, 1998). Esta família é uma das maiores e mais complexas dentre as famílias da ordem

Characiformes, contendo 65% das espécies válidas e aproximadamente 21% das espécies de peixes descritas da ictiofauna neotropical (Reis et al., 2003).

As espécies pertencentes à família Characidae podem ser diferenciadas dos demais grupos de peixes de água doce neotropicais por possuírem o corpo coberto com escamas (exceto *Gymnogharacínus* spp.), nadadeiras pélvicas em posição ventral no corpo geralmente situadas bem atrás da inserção das nadadeiras peitorais (Britski et al., 1999; Reis et al., 2003).

Em razão de sua grande capacidade adaptativa, grande variedade de espécies com hábitos distintos, esta família é considerada um grupo polifilético (Nelson, 2006), pois aproximadamente 85% dos gêneros de Characidae são *incertae sedis* (Reis et al., 2003), pois destes, 64% são taxonomicamente pouco conhecidos e, possivelmente, pertencem a gêneros que além de muitos especiosos não possuem indícios de serem monofiléticos, tais como *Hyphessobrycon* (97 espécies), *Astyanax* (86 espécies), *Moenkhausia* (58 espécies), *Bryconamericus* (51 espécies), *Hemigrammus* (51 espécies) (Lima et al., 2003).

De acordo com Reis et al. (2003), espécies pertencentes a essa família ocorrem em praticamente todos os ambientes de água doce, distribuindo-se nos continentes americano (desde a fronteira México - Estados Unidos até o sul da Argentina) e africano (Lucena, 1993; Mirande, 2010) e são conhecidos vulgarmente como lambaris, dourados, pacus, matrinxãs, peixes-cachorro, entre muitos outros. Possuem hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e exploram uma grande variedade de habitats. Os peixes desse grupo são coletados com relativa facilidade na

maioria dos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimes encontrados (Britski, 1972).

A sub-família Bryconinae, destaca-se como um grupo de ampla distribuição geográfica, da América do Sul a América Central (Britski et al., 1988; Lima, 2003), sendo composta por 43 espécies (Mariguela et al., 2010), a qual compreende três gêneros, *Brycon* (Müller & Troschel, 1844), *Chilobrycon* (Gery, deRhan, 1981) e *Hemichilus* (Garman, 1980), as quais são representadas apenas por uma espécie (Lima et al., 2003).

Algumas espécies de Bryconinae possuem grande interesse e valor econômico, uma vez que apresentam crescimento rápido, baixa taxa de mortalidade, bom desempenho reprodutivo e uma melhor resistência a doenças (Baras et al., 2000; Moreira et al., 2001; Silva et al., 2002).

Embora as espécies representantes desta subfamília tenham grande importância econômica, os estudos a respeito dos aspectos genéticos e biológicos são escassos (Mariguela et al., 2010).

1.5 Características do gênero *Brycon*

O gênero *Brycon*, pertencente a subfamília Bryconinae, é considerado um importante grupo de peixes pertencentes a Região Neotropical (Antunes et al., 2010), e compreende 41 espécies das quais apenas 9 possuem descrição cromossômica, representando 25% das espécies (Mariguela et al., 2010).

De acordo com Mendonça & Melo (1994) e Sanches et al. (2007), as espécies do gênero *Brycon* vêm despertando o interesse das instituições de pesquisa nos últimos anos, sendo de extrema importância para a pesca extrativista, devido à excelente qualidade da carne, ao hábito alimentar onívoro,

o rápido crescimento e ganho de peso. Essas características constituem ótimos indicadores para a seleção desses peixes como alternativa para o desenvolvimento da piscicultura.

O gênero está distribuído da América Central à América do Sul (Antunes et al., 2010), ou seja, do México à bacia do rio Prata (Lima & Castro, 2000; Filho et al., 2006). Distribuem-se pelas principais bacias hidrográficas brasileiras tais como Amazônica, Paraná, Paraguai e Araguaia-Tocantins (Antunes et al., 2010), sendo que na bacia Amazônica ocorre *Brycon amazonicus*, nas bacias do Paraná e Uruguai o *Brycon orbignyanus*, no rio São Francisco o *Brycon lundii*, na bacia do rio Paraguai o *Brycon hilarii* e na bacia do Rio Paraíba do Sul o *Brycon insignis*, sendo considerado portanto, um endemismo para cada região Brasileira (Filho et al., 2006; Antunes et al., 2010).

As espécies pertencentes ao gênero *Brycon* habitam águas claras, ricas em oxigênio, alimentam-se principalmente de frutas, sementes e insetos (Sabino & Sazima, 1999; Lima & Castro, 2000). Ainda, algumas de suas espécies, normalmente as de porte maior, passam por grandes períodos migratórios nos períodos de cheias dos rios a fim de reproduzir-se (Howes, 1982; Lima, 2003).

1.5.1 Caracterização das espécies parentais

Dentre os diversos peixes nativos brasileiro que, despertam o interesse dos piscicultores devidos às suas características de crescimento rápido, boa conversão alimentar, facilidade de reprodução induzida e até por

características apropriadas a pesca esportiva (Tavares-Dias et al., 1999) destacam-se as espécies do gênero *Brycon*.

Dentre elas, o matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), é uma espécie nativa das bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia (Howes, 1982) e é reconhecida pelo seu grande potencial para a aquicultura por apresentar alta taxa de crescimento, ótimo desempenho em cativeiro e alta qualidade e sabor de sua carne (Rocha et al., 1982; Zaniboni Filho et al., 2006). Estudos demonstram que o matrinxã é bem tolerante a procedimentos de captura e ao adensamento sem mostrar sinais de estresse (Rocha et al., 2004; Brandão et al., 2005). Além disso as suas características reofílicas, a capacidade de nadar longas distâncias a fim de se reproduzir e o formato hidrodinâmico de seu corpo permitem boas respostas a testes de crescimento tanto no campo, quanto no laboratório sob condições de exercício moderado (Arbeláez-Rojas et al., 2007; Hackbarth & Moraes, 2006).

Esta espécie é encontrada na maior parte da Amazônia Central (Santos et al., 2006; Lima 2003), sendo também chamada de “Jatuarana” na bacia do rio Madeira (Goulding 1979, 1980). Tem distribuição ao longo do rio Solimões-Amazonas e tributários, na bacia do rio Orinoco e no rio Essequibo na Venezuela (Lima, 2003).

Outra espécie pertencente ao gênero *Brycon* que desperta o interesse na piscicultura é a Piraputanga, *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). É originária da bacia do Prata e encontrada no médio Paraná e por toda a Bacia do rio Paraguai (Sanchez et al., 2007). Essa espécie apresenta um amplo espectro alimentar, incluindo organismos animais e vegetais, tanto aquáticos como terrestres (Zuntini, 2004). Em sua fase juvenil, alimenta-se principalmente de

insetos e peixes enquanto que na fase adulta, predominantemente de alimentos de origem vegetal. É considerado a principal atração ecoturística das águas da região de Bonito, MS (Sabino & Andrade, 2003). É reconhecida por seu hábito migratório e pela qualidade de sua carne (Filho et al., 2006; Sanches et al, 2007; Antunes et al., 2010).

1.5.2 Características citogenéticas das espécies parentais

Todas as espécies de Bryconinae analisadas apresentam um complemento cariotípico formado por 50 cromossomos (Margarido et al., 1996, 1999; Wasko et al., 2000; Parada et al., 2003; López et al., 2008; Mariguela et al., 2010), indicando que esta subfamília é caracterizada por uma grande estabilidade cariotípica em nível numérico.

No entanto, ainda é considerado raros os estudos citogenéticos aplicados no gênero *Brycon*. Em uma investigação feita por Mariguela et al., (2010), existem apenas nove espécies de *Brycon* investigadas, o que corresponde a pouco mais de 20% das espécies do gênero. Dentro desse mesmo levantamento e de acordo com Daniel-Silva, (2001) todas as espécies de *Brycon* até hoje estudadas, apresentam um número fundamental alto, com valores de 94 a 100, sendo que *B. amazonicus* e *B. hilarii* mostraram grande variação em suas fórmulas cariotípicas o que pode caracterizar rearranjos cromossômicos das diversas populações (Parada et al., 2003; Mariguela et al., 2010).

Um característica citogenética predominante para as espécies do gênero de *Brycon* é a presença do primeiro par de cromossômicos, maior que os demais sendo este metacêntrico, podendo ser utilizada como marcador

cromossômico para a família Bryconinae (Parada et al., 2003; López et al., 2008; Mariguela et al., 2010). Outra característica predominante para o gênero é o padrão da heterocromática constitutiva, onde seu primeiro par de cromossomos metacêntricos possuem marcações pericentroméricas em ambos os braços cromossômicos (Mariguela et al., 2010; Margarido et al., 1999). No entanto, no restante do complemento padrão, há grandes divergências entre a distribuição de heterocromatina constitutiva, o que pode representar uma importante ferramenta na caracterização e diferenciação das espécies, constituindo assim, em um importante marcador citogenético para o gênero *Brycon* (Wasko, 2000; Margarido et al., 1996).

A utilização em conjunto das técnicas de coloração com nitrato de Prata, fluorocromo CMA₃ e a técnica de FISH com sonda de DNAr 18S tem mostrado marcações correspondentes na maioria das espécies do gênero (Wasko et al., 2001). No entanto, nos recentes estudos realizados por Mariguela et al. (2010), foi comprovado haver marcações adicionais de dois outros pares cromossômicos para o gene 18S, dados esses diferentes com os apresentados até então na literatura por outros autores.

Dados citogenéticos referentes ao gene ribossômico 5S ainda são escassos em Bryconinae, mas parecem demonstrar o predomínio de apenas um par cromossômico portador destes sítios ribossomais (Wasko et al., 2001; Mariguela et al., 2010).

Até o presente momento, não há histórico de estudos envolvendo resultados de hibridação entre *B. amazonicus* e *B. hilarii*, fato que torna este trabalho em um importante instrumento de avaliação da viabilidade da produção do híbrido das espécies envolvidas.

1.6 Objetivos

Considerando que os estudos genéticos em híbridos interespecíficos de peixes ainda são escassos e, em sua maioria, não estão relacionados a projetos de cultivo, o presente projeto tem como objetivos principais:

- 1) Identificar geneticamente, utilizando marcadores citogenéticos, espécies e estoques de peixes de interesse comercial que representam as linhagens parentais das espécies matrinxã (*Brycon amazonicus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e o produto da hibridação de ambas as espécies.
- 2) Estabelecer marcadores genéticos para possíveis diagnósticos que permitam a identificação precisa de indivíduos e populações parentais, bem como das linhagens híbridas e que sejam adequados para o emprego prático no manejo da hibridação em pisciculturas brasileiras;
- 3) Promover a ordenação de dados biológicos de espécies e de linhagens híbridas que representem informações importantes para a piscicultura, com relação à dinâmica do processo de hibridação, tanto para fins comerciais como para fins de pesquisa básica.



*Materials &
Métodos*

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Tendo em vista o interesse de identificar geneticamente as espécies parentais matrinxã (*Brycon amazonicus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e o produto da hibridação entre ambas (Figura 1), foram coletados exemplares destas espécies dos estoques mantidos no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade (CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP), que também é o local onde (indivíduos resultantes deste cruzamento foram produzidos.

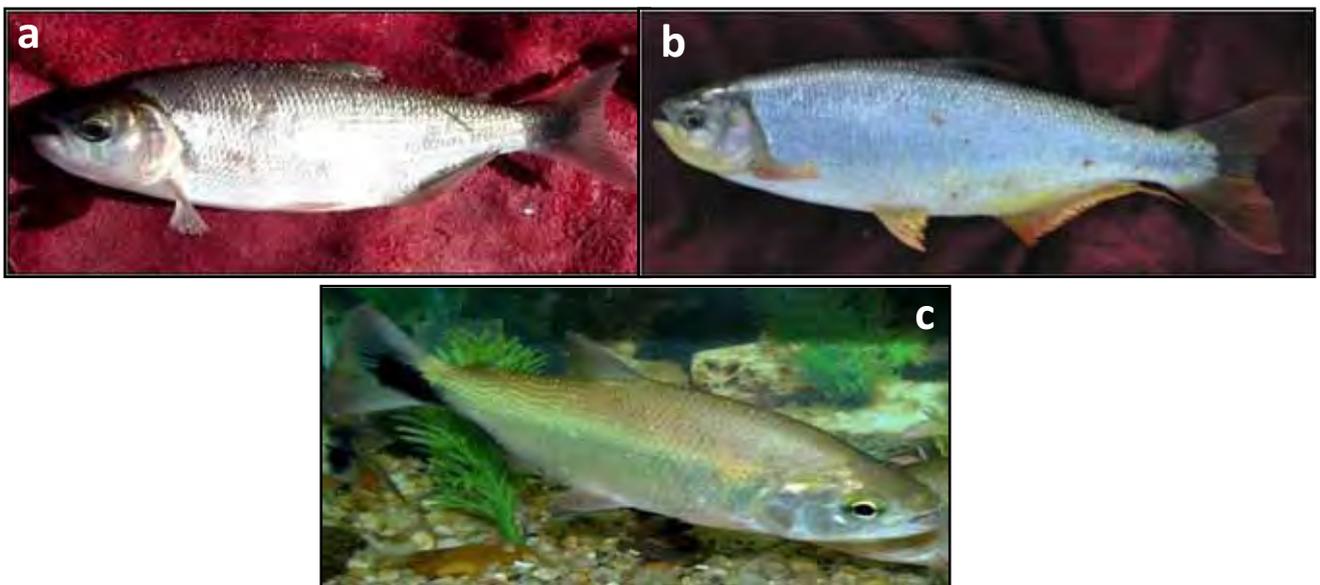


Figura 1 - Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*) (a), piraputanga (*Brycon hilarii*) (b) e do produto da hibridação (c).

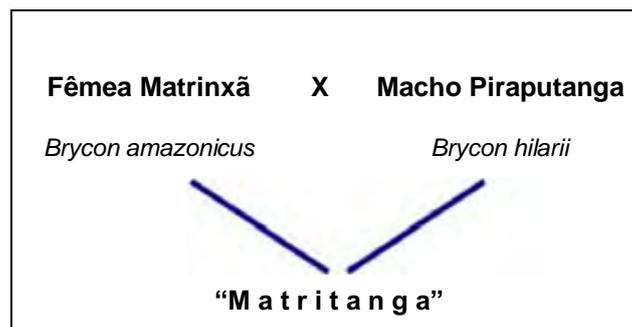
O CEPTA/ICMBio (Figura 2), foi criado em 1979 com o objetivo de "contribuir para o uso sustentável dos recursos ícticos tropicais, através da geração, adaptação e difusão de conhecimentos científicos, tecnológicos e ambientais em benefício da sociedade". Assim, o CEPTA/ICMBio realiza pesquisas sobre a biodiversidade dos recursos íctios de águas continentais, que envolvem recursos genéticos; uso sustentável dos recursos pesqueiros (pesca e aquicultura); melhoria da qualidade ambiental; capacitação de recursos humanos e educação ambiental. O Centro tem como objetivo o estabelecimento de parcerias com instituições nacionais e internacionais, universidades, organizações não governamentais e com a iniciativa privada, buscando sempre a consecução de suas competências.



Figura 2 – Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), Pirassununga. SP.

Em uma etapa de coleta, a partir de cruzamentos interespecíficos artificiais realizados, deu-se início ao estudo do processo de hibridação entre as espécies parentais matrinxã (*Brycon amazonicus*) e piraputanga (*Brycon hilarii*), originando os híbridos interespecíficos “**matritanga**” (fêmea de *Brycon amazonicus* e macho de *Brycon hilarii*) (Figura 1 e Esquema 1).

Foram analisados citogeneticamente 30 indivíduos (10 exemplares de *Brycon amazonicus*, 10 *Brycon hilarii*, 10 indivíduos produtos da hibridação. Não foi possível analisar geneticamente o híbrido interespecífico “Pirapuxã”, pois não foi possível realizar os cruzamentos envolvendo as espécies parentais.



Esquema 1 - Esquema dos cruzamentos envolvendo as espécies parentais originando seus respectivos produtos da hibridação.

Além dos animais estudados citogeneticamente, também foram coletadas amostras de material biológico (sangue ou nadadeira) e preservados em etanol 95% formando um banco de tecidos para as futuras análises moleculares.

Por fim, os animais utilizados nos estudos genéticos foram fixados em formol 10%, conservados em etanol 70%, identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP, Campus de Bauru, SP.

2.2. Métodos

Nas análises citogenéticas das amostras foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Lozano et al., 1988; Oliveira et al., 1988), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti et al., 1981), coloração das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) com nitrato de Prata (Howell & Black, 1980), caracterização dos padrões de heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972), detecção de regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC com a técnica que emprega o corante Cromomicina A₃ (CMA₃) (Schweizer, 1976) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Porto-Foresti et al., 2002), com sondas de DNA ribossômico (DNAr) 18S e 5S. Para montagem dos cariótipos, utilizouse a técnica descrita por Levan et al. (1964) e Porto Foresti et al. (2008).

2.2.1 Estimulação de mitoses

Para obtenção de maior número de mitoses nas preparações cromossômicas foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular por injeção de solução de fermento biológico nos exemplares, descrita inicialmente por Cole & Leavens (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee & Elder (1980) para pequenos mamíferos e por Lozano et al. (1988) e Oliveira et al. (1988) para peixes. O procedimento utilizado consiste em:

- 1 preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2 incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min.;

3 injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal. A injeção da quantidade total é realizada em duas doses, dividida e aplicada no período de 48 h;

4 manter o animal em aquário bem aerado.

2.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos de peixes (técnica *in vivo*)

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos de peixes *in vivo* foi a descrita por Foresti et al. (1981) e utilizada com algumas adaptações. O procedimento consiste em:

1 injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 0,5 ml / 100 g de peso do animal;

2 deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 min.;

3 sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);

4 dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;

5 transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 min.;

6 retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min. à temperatura ambiente;

- 7** adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min.;
- 8** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min. a 900 ± 100 rpm;
- 9** repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
- 10** pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar;
- 11** as lâminas foram guardadas no congelador, mantendo-se conservadas para a aplicação de técnicas de bandamento cromossômico.

2.2.3 Detecção da região organizadora de nucléolo (Ag-NOR)

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell & Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentam-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1 g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C . Segue abaixo o protocolo utilizado para a coloração da NOR.

- 1** hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 min. em HCl 1N a 60°C ;
- 2** secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 3** deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C . Em alguns minutos (aproximadamente três), a mistura das soluções se torna

marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada, retirando a lamínula e deixar secar;

4 corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 seg.;

5 deixar secar ao ar.

2.2.4 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972) com algumas adaptações, que consiste em:

1 hidrolisar o material contido nas lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente e posteriormente lavar com água destilada;

2 passar por uma solução de BaOH₂ a 5% por cerca de 7 segundos e posteriormente lavar com água destilada;

3 banhar em HCl 1N a 60^o.C e então lavar novamente com água destilada;

4 incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH=6,8) a 60^o.C e lavar com água destilada;

5 corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 7,5% em tampão fosfato (pH=6,7).

2.2.5 Bandamento com o fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃)

O procedimento utilizado para a detecção de regiões ricas em pares de bases GC seguiu a técnica descrita por Schweizer (1976), com algumas adaptações.

- 1 Colocar as lâminas em cubetas e imergi-lás com uma solução de tampão McIlvaine + MgCl₂ à temperatura ambiente por 10 minutos;
- 2 Agitar as lâminas e secar o lado de trás. Colocar 20µl de CMA₃ (0,5mg/ml) por gota de preparação, cobrir com lamínulas e deixar o conjunto em caixa escura por 15 minutos à temperatura ambiente;
- 3 Retirar as lamínulas em tampão McIlvaine lavando as lâminas vagarosamente nessa solução;
- 4 Incubar as lâminas em solução de Methyl-greem/Hepes por 15 minutos;
- 5 Lavar as lâminas em solução de Hepes/NaCl;
- 6 Secar as lâminas, pingar uma solução de glicerol com propilgalato e colocar lamínula para montagem das lâminas permanentes;
- 7 Deixar as lâminas no escuro e na geladeira por pelo menos 30 dias antes de analisar e fotografar em microscopia de fluorescência.

2.2.6 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr

Obtenção das sondas

Para realização da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes foram obtidas duas sequências de DNA ribossômico (DNAr) (18S

DNAr e 5S DNAr). As sondas de DNAr 18S e 5S foram obtida de ambas as espécies parentais através da amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction), conforme descrito por Pendás et al. (1994).

Inicialmente, o DNA foi marcado com biotina-dATP ou digoxigenina-dUTP pela técnica de nick translation, segundo as instruções do fabricante (Bionick™ Labelling System-Gibco.BRL). Após as marcações, procedeu-se à técnica de hibridização utilizada por Porto-Foresti et al. (2002), e as lâminas foram contracoradas com Iodeto de Propídeo ou DAPI.

Marcação do DNA pela técnica de nick translation

Inicialmente, o DNA foi marcado com biotina-dATP ou digoxigenina-dUTP pela técnica de nick translation, segundo as instruções do fabricante (Bionick™ Labelling System-Gibco.BRL). Após a marcação das sondas, procedeu-se a técnica de hibridação descrita por Porto-Foresti et al. (2002), com algumas adaptações. Para marcação com biotina-dATP ou digoxigenina-dUTP, foi seguido o seguinte protocolo:

1 em um tubo de 0,5 ml preparar uma solução contendo 5 µl de uma solução de 10X dNTP (contendo 0,1 mM de biotina-dATP ou digoxigenina dUTP), 5 µl de uma solução tamponada de enzimas (0,0075 unidades/ µl de DNase I e 0,5 unidades/ µl 31 de DNA polimerase I), 1 µg de DNA (gene de interesse 18S ou 5S) e água para um volume final de 45 µl. Misturar a solução em um vórtex e centrifugar brevemente a 14.000 rpm;

2 incubar a 16°C por 1 hora.

3 adicionar 5 µl de um tampão de bloqueio (stop buffer).

- 4** adicionar 5 µl de uma solução a 3M de acetato de sódio e 120 µl de etanol absoluto gelado (-20°C). Misturar os componentes invertendo várias vezes o tubo contendo a mistura e incubar a -70°C por 30 minutos ou -20°C por 2 horas;
- 5** centrifugar a 14.000 rpm por 10 min. Remover e descartar o sobrenadante;
- 6** ressuspender o DNA em 500 µl de etanol a 75% gelado (-20°C). Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos. Remover o sobrenadante e secar o DNA a temperatura ambiente;
- 7** adicionar 20 µl de uma solução de hibridação (50% formamida deionizada, 10% dextran sulfato, 2XSSC e 20 mg/ml de albumina fetal bovina). Estocar o DNA a - 20°C.

Hibridação

- 1** Incubar as lâminas em uma solução contendo 200 µl de 2XSSC (pH=7,0) e 2 µl de RNase (100 mg/ml) em uma câmara úmida a 37°C por 1 hora;
- 2** em um coplin de vidro, preparar 40 ml de uma solução de desnaturação (70% Formamida, 2XSSC) e aquecer a 72°C em um banho-maria. Colocar as lâminas na solução de desnaturação e incubar por 2 a 3 minutos;
- 3** desidratar as lâminas em banhos sucessivos em etanol a 70%, 85% e 100% a - 20°C por 3 minutos cada. Deixar as lâminas secando ao ar;
- 4** desnaturar as sondas incubando-as em um banho-maria a 72°C por 5 minutos;
- 5** colocar 7,5 µl da solução com as sondas + 7,5 µl de solução de hibridação em cada gota de preparação e cobrir com lamínula (no caso do “double FISH”

coloca-se as duas sondas juntas na lâmina a ser hibridizada, em iguais concentrações) ;

6 incubar as lâminas a 37°C por cerca de 15 horas (over night) em uma câmara úmida;

7 remover as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de 50% formamida/2XSSC por 10 minutos cada. Nesse passo, a estringência da reação pode ser aumentada ou diminuída, na mesma proporção em que a concentração de formamida for maior ou menor, respectivamente;

8 lavar as lâminas duas vezes em 2XSSC por 10 minutos a 42°C;

9 secar as lâminas e aplicar, em cada gota de preparação celular, 15 µl do reagente de detecção (avidina marcada com fluoresceína ou digoxigenina marcada com rodamina) e cobrir com uma lamínula.

10 Incubar as lâminas a 37°C por 15 a 60 minutos em uma câmara úmida;

11 remover as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de PBD (PBS com 1% de Triton X-100) por 5 minutos a temperatura ambiente;

12 lavar as lâminas em uma solução de PBS (tampão fosfato) por 5 minutos a temperatura ambiente;

Para as sequências com um número grande de cópias, como as sequências de DNAr 18S e 5S estudadas, procedeu-se diretamente com a contra-coloração (utilizou-se os corantes Iodeto de propídeo ou DAPI) e análise em fotomicroscópio de fluorescência.

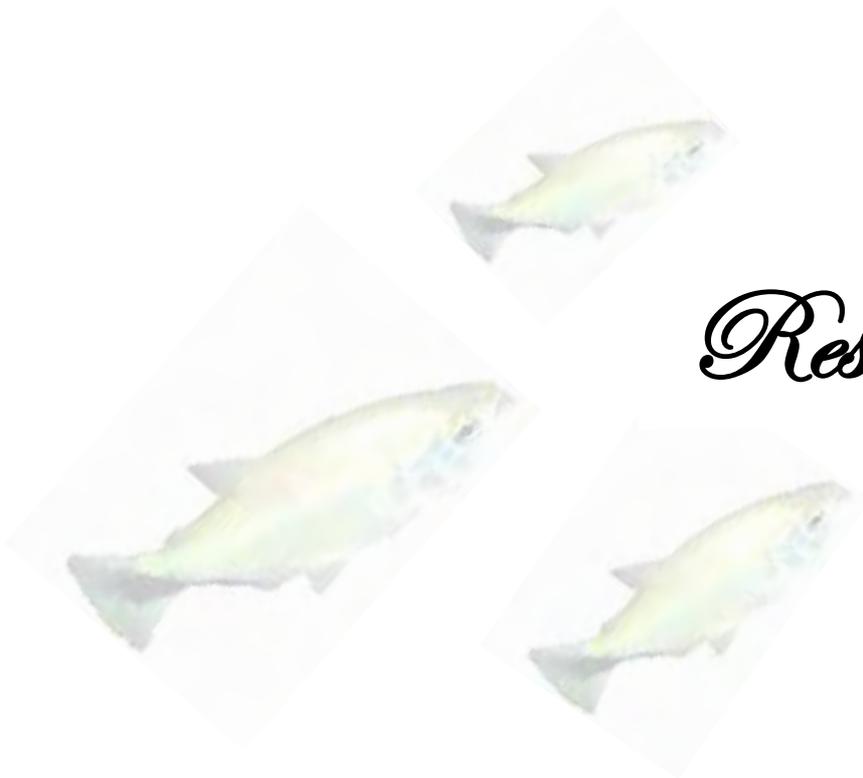
2.2.7 Estudos Cariotípicos

A partir dos dados obtidos pelas análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases em cada indivíduo estudado, procurou-se estabelecer um número diploide modal para os exemplares de cada espécie. Assim, as melhores metáfases ou as que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas em fotomicroscópio da marca OLYMPUS, modelo BX50, com objetiva de imersão de 100X.

Para a técnica de Cromomicina A₃ (CMA₃) e FISH, foram utilizados filtros de fluorescência com objetiva de imersão e as preparações cromossômicas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX50, equipado com EpiFluorescência.

2.2.8 Montagem dos Cariótipos

Os cromossomos recortados e dispostos em cartolina com fita adesiva foram inicialmente arranjados de acordo com seu tamanho e morfologia, sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), emparelhados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho para a organização final do cariótipo, conforme descrito por Levan et al. (1964). O cariótipo do híbrido foi organizado de acordo com Porto-Foresti et al. (2008).



Resultados

3 RESULTADOS

Todos os exemplares analisados de matrinxã (*Brycon amazonicus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e do produto da hibridação entre a fêmea do matrinxã e o macho piraputanga, coletados no CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP, apresentaram a mesma constituição cariotípica representada por $2n=50$ cromossomos e número fundamental igual a 100.

Foi possível observar que dentre todos os cromossomos do complemento padrão das espécies *Brycon amazonicus*, *Brycon hilarii* e sua respectiva geração filial (F1), destaca-se o primeiro par cromossômico, o qual apresenta um tamanho maior que os demais do complemento padrão e é claramente caracterizado como metacêntrico.

No entanto, houve diferenciação na formação cariotípica dos parentais, onde o parental Matrinxã (*Brycon amazonicus*) apresentou um cariótipo composto por seis cromossomos do tipo metacêntrico, nove cromossomos do tipo submetacêntrico e dez cromossomos do tipo subtelocêntrico ($6m+9sm+10st$) (Figura 3a), enquanto que o parental Piraputanga (*Brycon hilarii*) apresentou uma constituição cariotípica de dez cromossomos do tipo metacêntrico, nove cromossomos do tipo submetacêntrico e seis cromossomos do tipo subtelocêntrico ($10mt+9sm+6st$) (Figura 3b) e sua respectiva geração filial apresentou um cariótipo correspondente ao seu parental Matrinxã, ou seja, seis cromossomos do tipo metacêntrico, nove cromossomos do tipo submetacêntrico e dez cromossomos do tipo subtelocêntrico ($6m+9sm+10st$) (Figura 3c).

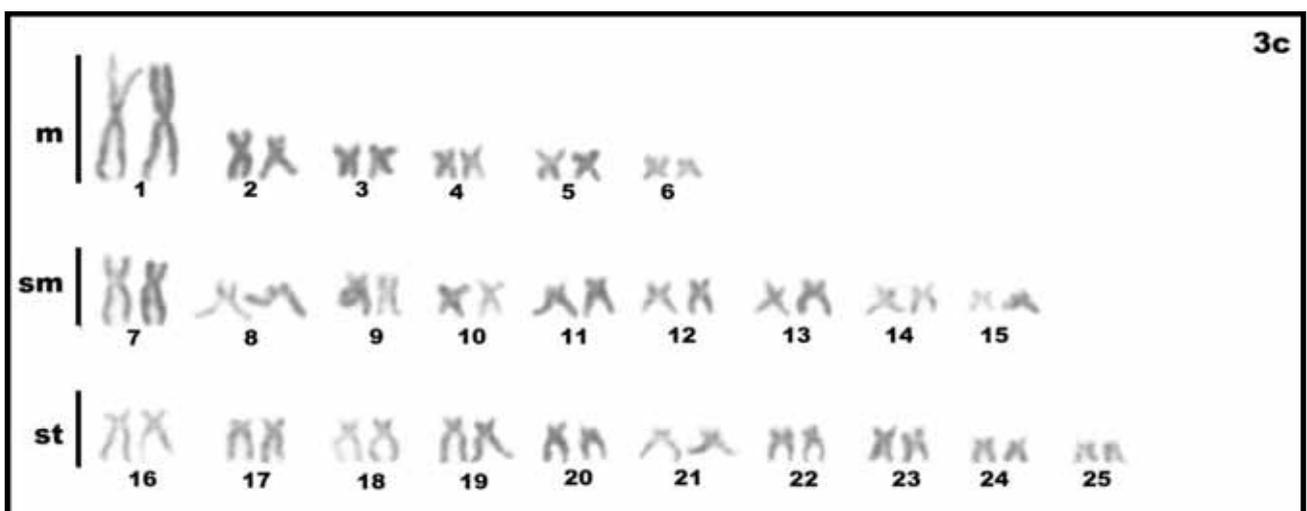
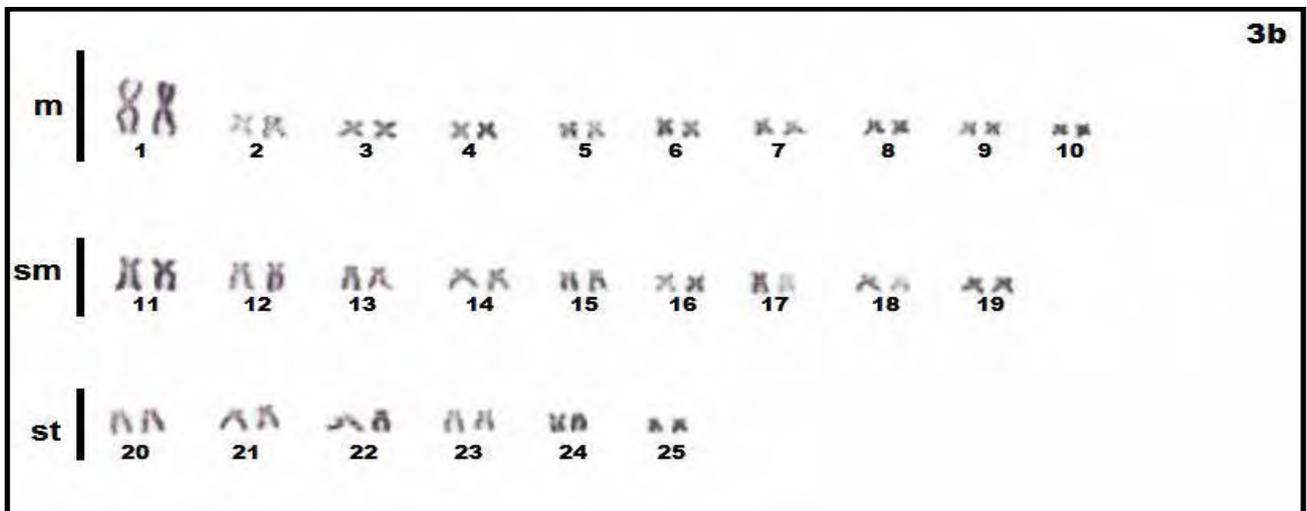
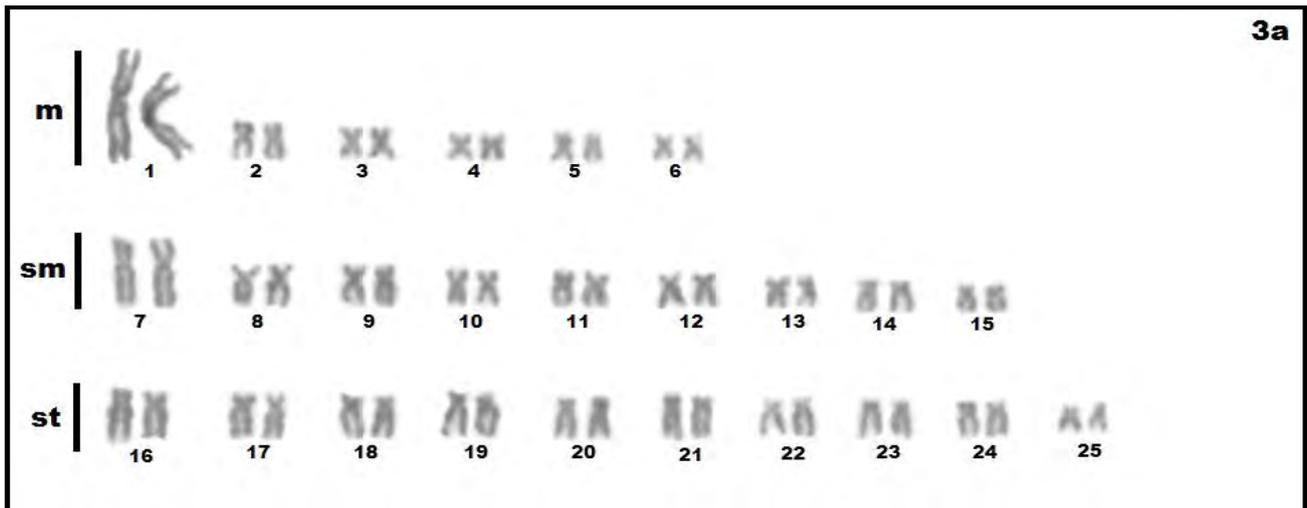


Figura 3 – Cariótipo das espécies parentais Matrinxã (*Brycon amazonicus*) (a) e Piraputanga (*Brycon hilarii*) (b) e da geração Filial (c).

A análise das regiões ricas em heterocromatina constitutiva, por meio da técnica de bandamento C foi realizada em todos os indivíduos. Observou-se que *Brycon amazonicus* apresenta 11 pares de cromossomos com regiões banda C positivas (2m, 4sm e 5st) (Figura 4a), enquanto que *Brycon hilarii* apresenta dez pares cromossômicos com marcações positivas para a heterocromatina constitutiva (3m, 4sm e 3st) (Figura 4b) e o produto da hibridação, apresentou o mesmo padrão do parental *Brycon amazonicus*, ou seja, 11 pares cromossômicos com blocos heterocromáticos positivos (2m, 4sm e 5st) (Figura 4c). É notável que em todos os indivíduos estudados, o primeiro par de cromossomos metacêntrico, apresenta o mesmo padrão de heterocromatina constitutiva, isto é, blocos heterocromáticos nas regiões intersticiais de ambos os braços cromossômicos.

Constatou-se ainda, que o primeiro par de cromossomos do conjunto submetacêntrico de todos os indivíduos apresentou marcação banda C positiva na região pericentromérica do braço longo de ambos os cromossomos e o primeiro par de cromossomos do conjunto subtlocêntrico evidenciou regiões heterocromáticas centroméricas. A localização da heterocromatina constitutiva nos demais cromossomos do complemento padrão localiza-se em regiões centroméricas e pericentroméricas.

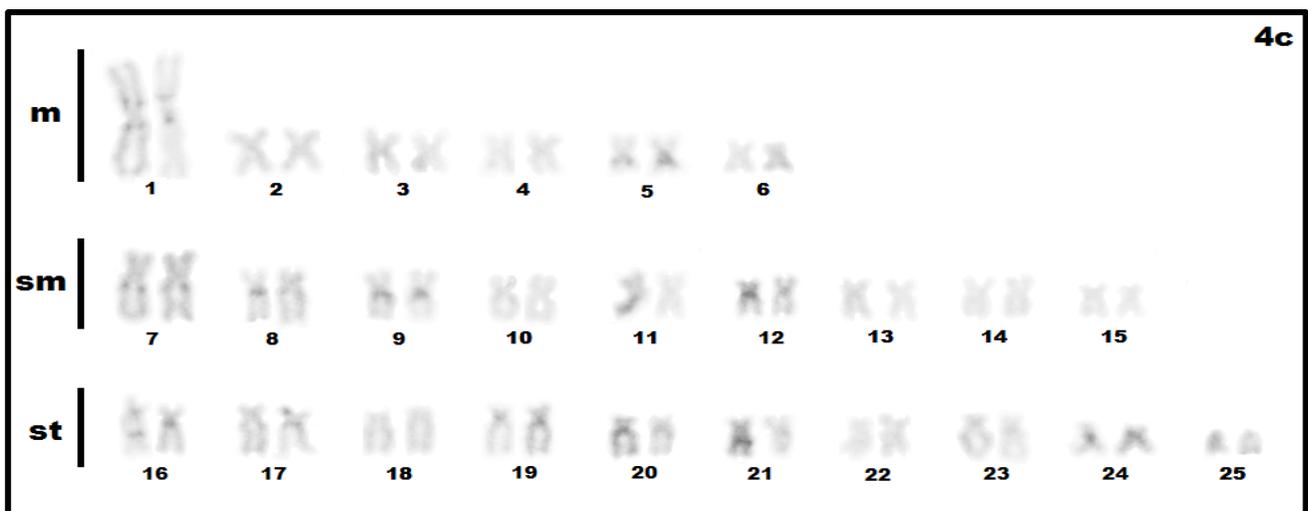
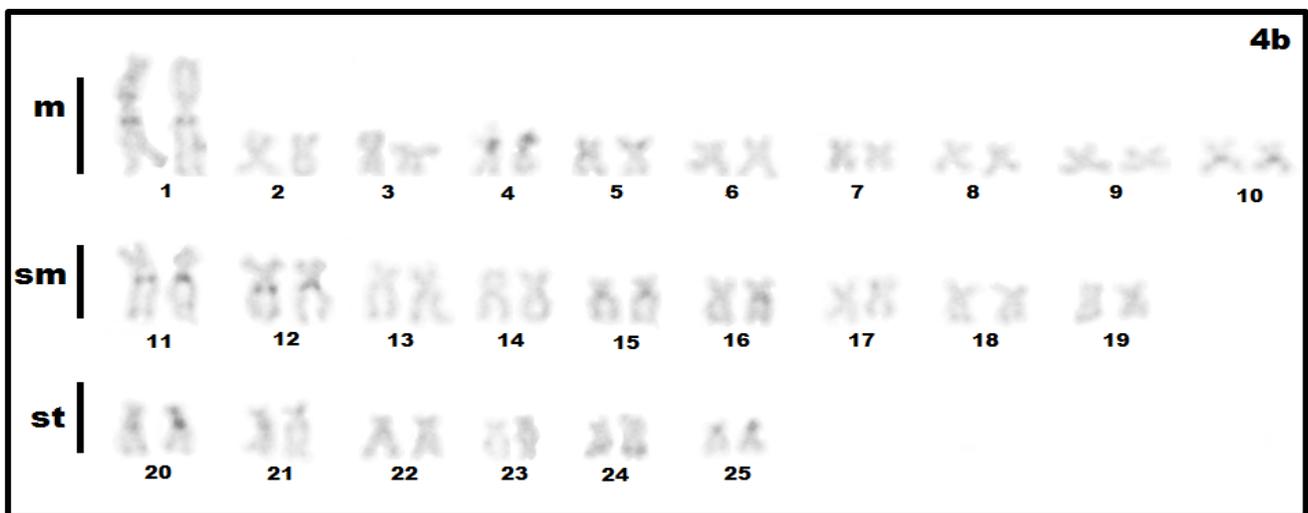
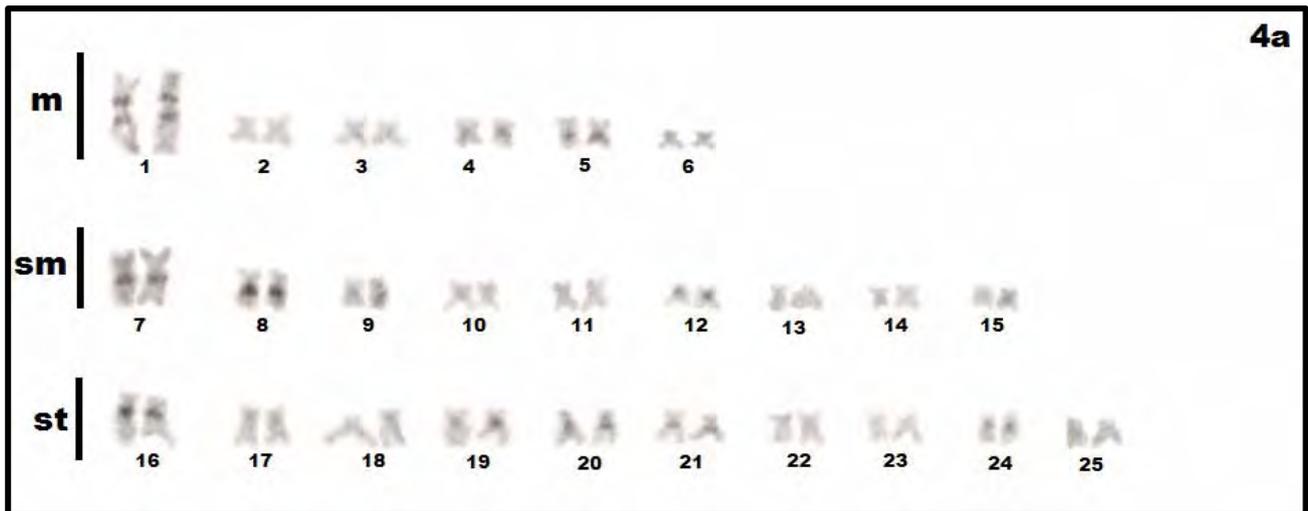


Figura 4 – Cariótipo evidenciando as Regiões de Heterocromatina Constitutiva (Banda C) das espécies Matrinxã (*Brycon amazonicus*) (a), Piraputanga (*Brycon hilarii*) (b) e da geração Filial (c).

Com a utilização da coloração com DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) nas duas espécies parentais e sua respectiva geração filial foi possível observar regiões cromossômicas ricas em A-T, concomitantemente nas regiões de heterocromatina constitutivas descritas anteriormente (Figura 5), isto é, nas regiões centroméricas e pericentroméricas de alguns pares cromossômicos.

A detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos obtidas pela técnica de impregnação pelo nitrato de Prata (Ag-RONs) demonstrou marcações na região telomérica do braço longo de apenas um par de cromossomos subtelocêntricos nos parentais e em sua respectiva F1, não havendo diferenciações entre eles (Figura 6).

Os resultados obtidos pela técnica de impregnação por nitrato de Prata (Ag-RONs) para detecção das regiões de NORs foi coincidente com os resultados apresentados pela técnica de coloração cromossômica por cromomicina A₃ (CMA₃).

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sonda fluorescente (FISH) para o gene ribossômico 18S, sinalizou nas espécies parentais e na geração Filial, regiões cromossômicas coincidentes com as regiões formadoras de nucléolos, obtidas pela técnica de impregnação pelo nitrato de Prata, ou seja, todos os exemplares analisados apresentaram marcações nas regiões teloméricas de ambos os braços longos de um par de cromossomos subtelocêntrico (Figura 6).

Diferentemente dos resultados obtidos com as técnicas de Ag-NOR e FISH 18S, a hibridação *in situ* com sonda fluorescente para o DNAr 5S, demonstrou diferentes resultados para os indivíduos analisados. Para o parental *Brycon amazonicus* e sua respectiva geração filial, o DNAr 5S foi

observado na região pericentromérica do braço longo em um par de cromossomo submetacêntrico (Figura 7a; Figura 7c, respectivamente), enquanto que para o parental *Brycon hilarii*, este gene ribossômico encontrou-se localizado na região pericentromérica de um pequeno par de cromossomo metacêntrico (Figura 7b).

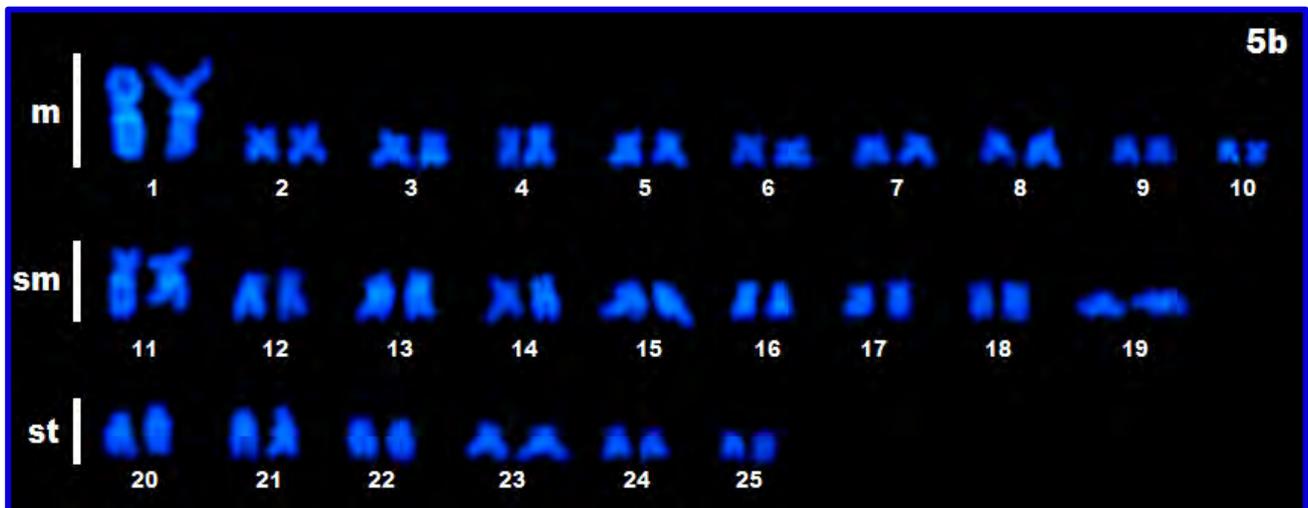
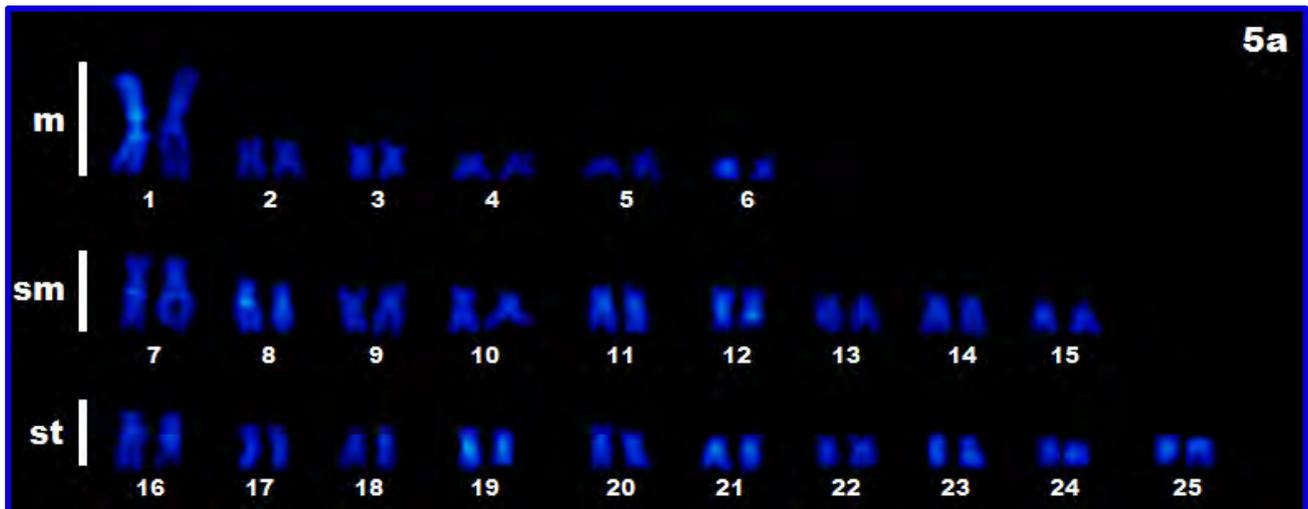


Figura 5 – Cariótipo corado com DAPI, evidenciando regiões ricas em A-T em regiões centroméricas e pericentroméricas espécies Matrinxã (*Brycon amazonicus*) (a), Piraputanga (*B. hilarii*) (b) e da geração Filial (c).

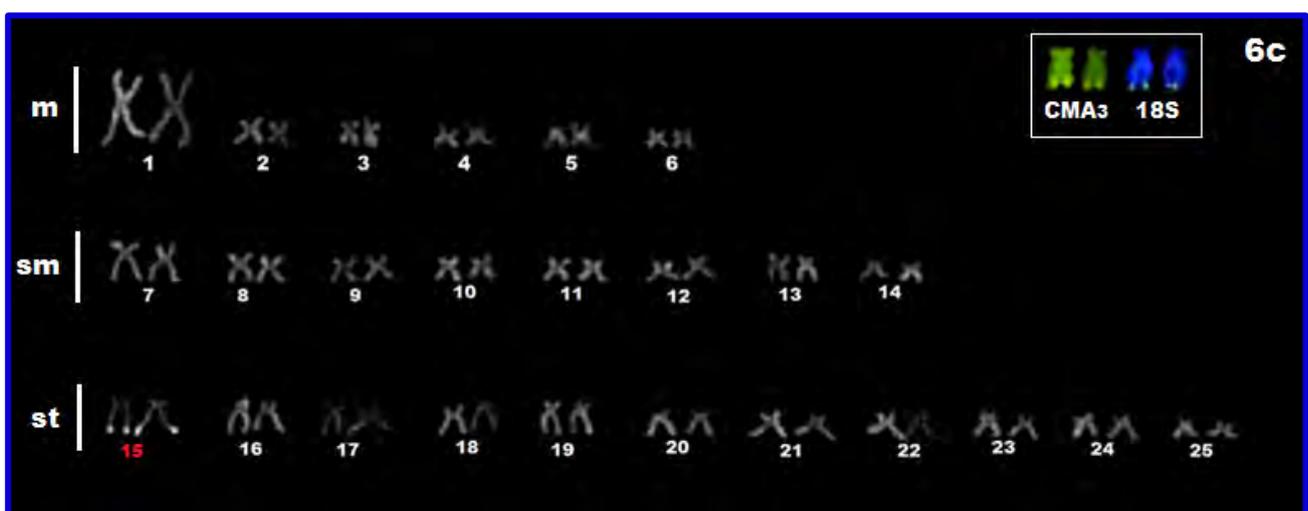
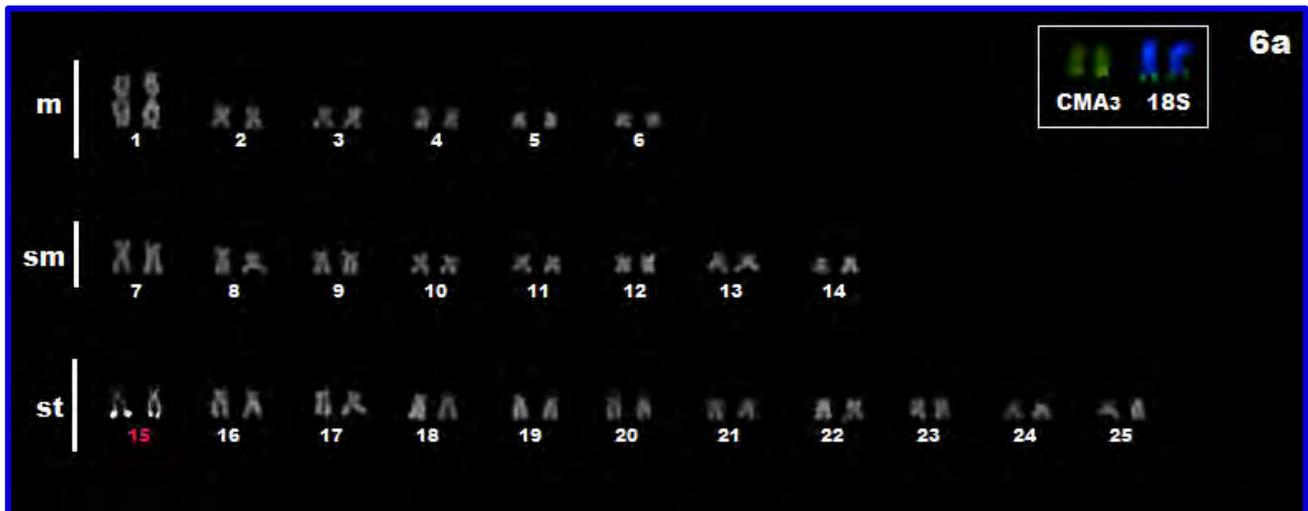


Figura 6 – Cariótipo evidenciando a Região organizadora de Nucléolo (NORs) em um cromossomo subtelo-cêntrico das espécies Matrinxã (*Brycon amazonicus*) (a), Piraputanga (*B. hilarii*) (b) e da respectiva geração Filial (c). Em destaque, o par cromossômico corado com CMA₃ evidenciando regiões cromossômicas ricas em G-C, e o par cromossômico subtelo-cêntrico portador do DNAr 18S.

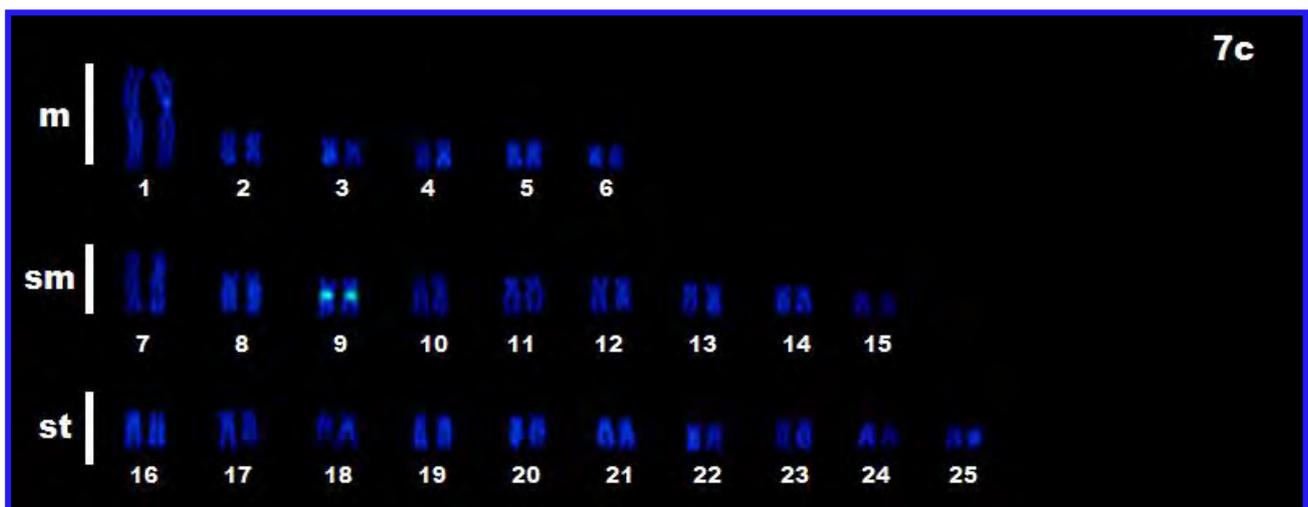
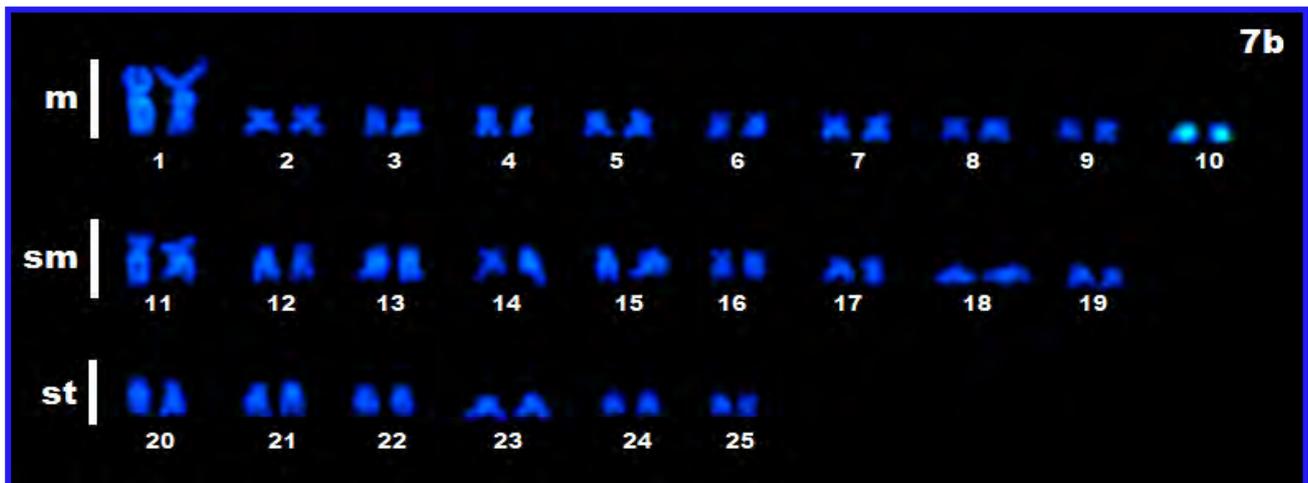
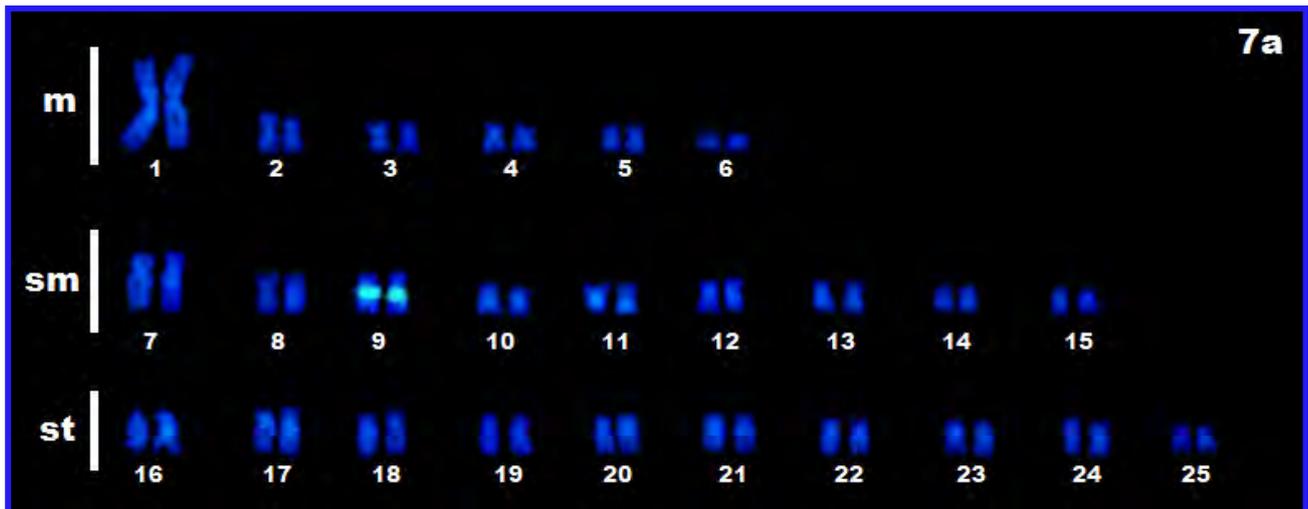
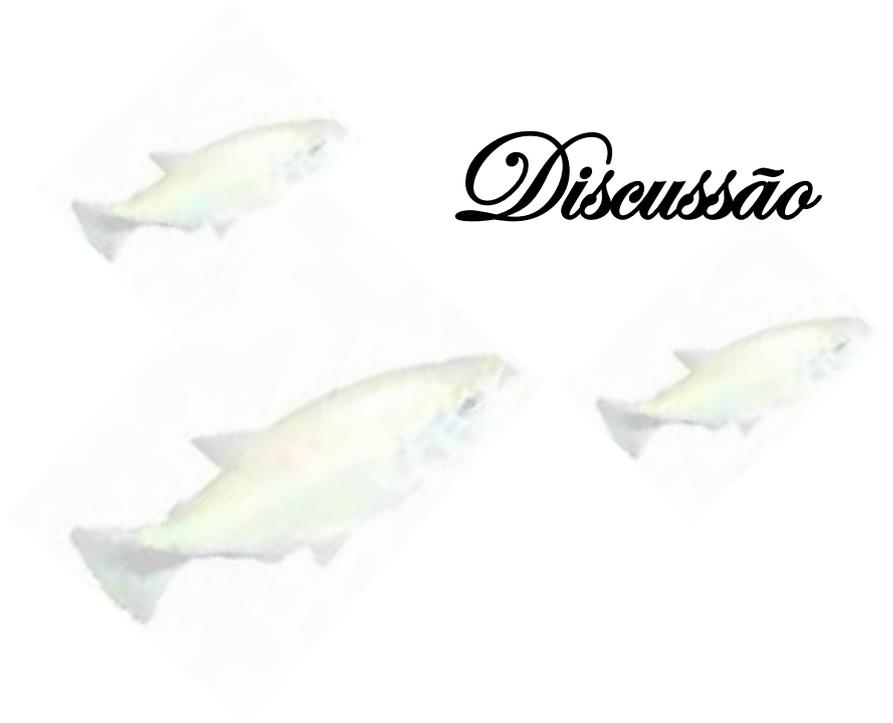


Figura 7 – Cariótipo evidenciando a localização do gene ribossomal 5S nas espécies Matrinxã (*Brycon amazonicus*) (a), Piraputanga (*B. hilarii*) (b) e do produto híbrido interespecífico (c).

Discussão



4 DISCUSSÃO

Apesar das diversidades cariotípicas, muitas espécies da família Characidae apresentam uma característica peculiar a qual tem se mantido conservada na maioria dos indivíduos analisados, que é a presença de um par de cromossomos metacêntrico. Esta característica corresponde ao primeiro par cromossômico, o qual é significativamente maior que os demais cromossomos do complemento padrão (Scheel, 1973) e foi relatado nos resultados deste trabalho.

Para as espécies da subfamília Briconinae, a presença de um grande par de cromossomos metacêntrico é considerado um marcador (Parada et al., 2003; López et al., 2008; Mariguela et al., 2010). Além deste fato, diversos autores tais como, Galetti Jr. et al. (1984), Wasko & Galetti Jr. (2000), López et al. (2008) e Mariguela et al., (2010), em seus estudos com espécies do gênero *Brycon*, indicaram uma estabilidade cromossômica quanto a sua ploidia, onde todos os indivíduos analisados possuíam $2n=50$ cromossomos, sendo esta uma característica estável do gênero (Margarido et al., 1999), confirmando nos resultados apresentados.

A estabilidade cromossômica do gênero *Brycon* pode ser explicada pela ausência de rearranjos cromossômicos significantes, conservando assim, seu número diploide (Margarido & Galetti, 1999; Parada et al., 2003; Brassesco et al., 2004, *apud* Mariguela et al, 2010). No entanto, ainda são poucos os estudos citogenéticos concernentes para o gênero *Brycon* (Arias, 2002) algumas variações no conjunto cromossômico do gênero podem ainda ocorrer

ao longo do tempo, embora este gênero seja reconhecido pela sua estabilidade cariotípica em nível numérico (Wasko et al., 2002).

A fórmula cariotípica apresentada pela espécie *Brycon amazonicus* (Matrinxã) neste trabalho (6m+9sm+10st), difere da análise feita por Almeida-Toledo et al. (1996), o qual sugere uma formula cariotípica composta por pares de 12m+13sm/st, enquanto que Margarido & Galetti, (1996) descreveram uma fórmula igual a 12m+10sm+3st. Daniel-Silva (2001) descreveu uma constituição cariotípica de 12m+13sm. Guevara et al. (2003) sugeriram uma constituição cariotípica de pares de 12m+13sm/st cromossomos, ao passo que Parada et al. (2003) descreveram um cariótipo formado por pares de 12m+13sm cromossomos e mais recentemente, Mariguela et al. (2010) demonstraram um cariótipo de 11m+7sm+7st pares de cromossomos.

A análise do cariótipo da espécie *Brycon hilarii* (Piraputanga) também revelou diferenças significativas quanto à caracterização de seus cromossomos. De acordo com Margarido & Galetti (1996) e Foresti et al. (2007) o cariótipo desta espécie é composto por 10m+12sm+3st, diferindo dos resultados obtidos neste trabalho, o qual demonstrou uma constituição cariotípica de 10 pares de cromossomos metacêntricos, nove pares de cromossomos submetacêntricos e 6 pares de cromossomos subtelocêntrico.

Com relação aos dados apresentados neste trabalho da geração filial, pudemos observar a mesma constituição cariotípica do parental *Brycon amazonicus* (Matrinxã), o que possivelmente poderia ser explicado pela ocorrência de indivíduos ginogênicos, que de acordo com Toledo-Filho et al. (1994), propõe que o projeto de hibridação que utilizar como parentais fêmeas (FF) e machos (MM) diploides simples poderá produzir oito diferentes tipos

genéticos, identificados como ginogenéticos haploides (F) e diploides (FF), como é o caso do relatado no presente trabalho.

Além disso, a diferença na fórmula cariotípica entre indivíduos da mesma espécie, dados descritos para as espécies parentais no presente trabalho, pode ser relacionada com a história Geológica e o desenvolvimento temporal dessas espécies em uma determinada localidade, ou seja, grupos de indivíduos da mesma espécie que permaneceram durante milhões de anos isolados, fixaram em seu pool gênico, rearranjos cromossômicos raros, e os resultados foram importantes mudanças cromossômicas, as quais se mantiveram e originaram para cada população, uma fórmula cariotípica diferente (Oliveira et al, 2009), acreditamos, portanto, ser esta a explicação plausível para a espécie *Brycon amazonicus*.

Ainda, Parada et al. (2003) discutem que uma possível causa de variação cariotípica entre espécies de uma mesma população está na dificuldade em definir e classificar os cromossomos em submetacêntricos e subtlocêntricos devido ao seu grau máximo de condensação, podendo nos levar a identificar um cromossomo submetacêntrico como subtlocêntrico, sendo esta a explicação mais plausível apresentada para a espécie *Brycon hilarii*.

As espécies do gênero *Brycon*, apresentam um padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva não-conservativa (Almeida-Toledo, 1996), o que pode representar uma ferramenta importante na caracterização e diferenciação das espécies, consistindo assim, uma vez que apresenta grande variabilidade, um importante marcador citogenético. No entanto, os estudos de

bandamento C são restritos e foram realizados em poucas espécies (Wasko, 2000).

Margarido et al. (1999) identificaram que a espécie *B. hilarii* possui blocos heterocromáticos na região centromérica da maioria dos cromossomos do complemento padrão, sendo possível visualizar um evidente bloco heterocromático na região intersticial dos braços longos e curtos do primeiro par de cromossomos metacêntricos, os quais se apresentam maiores que todos os demais cromossomos, sendo uma característica já discutida para esta subfamília. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os resultados apresentados por Margarido et al. (1999) observando que a mesma marcação do primeiro par de cromossomos metacêntricos da espécie *Brycon hilarii*, ocorre no parental *Brycon amazonicus* e também no produto obtido pelo cruzamento entre estas duas espécies.

Outra característica marcante para as espécies estudadas, a qual foi observada neste estudo, é a presença de blocos heterocromáticos na região centromérica/pericentromérica dos braços longos dos dois primeiros cromossomos submetacêntricos, fato demonstrado também por Daniel-Silva (2001) o qual analisou padrão de bandamento C de *Brycon cephalus* (espécie sinônimo de *Brycon amazonicus*), por Margarido et al. (1999), em seus estudos com as espécies *Brycon lundii* e *Brycon microlepis* (espécie sinônimo de *Brycon hilarii*), e mais recentemente por Mariguela et al. (2010) em seus estudos com *Brycon amazonicus*, sendo esta característica, portanto, conservada para as espécies do gênero *Brycon* (Margarido & Galetti Jr., 1996; 1999).

Mariguela et al. (2010) citaram que a espécie de *Brycon amazonicus* coletada no rio Orinoco na Venezuela, além de apresentarem o padrão de heterocromatina constitutiva do par cromossômico 1, observou-se também a presença de mais seis pares cromossômicos submetacêntricos com distribuição na região centromérica e pericentromérica do braço longo. Este dado em particular difere dos resultados apresentados no presente estudo para o parental *Brycon amazonicus*, o qual demonstrou padrão de heterocromatina constitutiva em dois pares cromossômicos metacêntricos, quatro pares cromossômicos submetacêntricos e cinco pares cromossômicos subtelocêntricos. Essa divergência pode ser explicada pela história Geológica e pelo desenvolvimento temporal dessas espécies, uma vez que ambas pertencem a populações e bacias distintas, sofrendo assim, diferentes pressões seletivas.

Os resultados de bandamento C obtidos para *Brycon hilarii* diferem dos dados contidos na literatura, onde nos estudos de Margarido & Galetti Jr. (1999), foi observado que *Brycon microlepis* (espécie sinônimo), possui três pares de cromossomos metacêntricos e cinco pares de cromossomos submetacêntricos portadores de blocos heterocromáticos, totalizando oito pares cromossômicos. Entretanto, a espécie estudada neste trabalho apresentou semelhança na quantidade de cromossomos metacêntricos com regiões de heterocromatina constitutiva positiva, mas é divergente quanto à quantidade de regiões de banda C positivas nos cromossomos submetacêntricos/subtelocêntricos. Mais uma vez, as divergências apresentadas pode ser resultado de uma frágil classificação em virtude do grau de condensação da preparação cromossômica. No entanto, a espécie *Brycon*

hilarii descrita deste trabalho, apresentou 10 pares cromossômicos com marcações banda C positivas, dois pares a mais que os estudos até recentemente publicados. De acordo com Margarido & Galetti Jr. (1996), as mudanças no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva pode desempenhar um papel importante na diferenciação cromossômica deste grupo de peixes, e são distribuídas em pelo menos dois padrões gerais: o primeiro padrão apresenta distribuição da heterocromatina principalmente em alguns cromossomos submetacêntricos, como é observado em *Brycon amazonicus* e *Brycon hilarii*, já o segundo padrão é caracterizado pela presença de heterocromatina em regiões teloméricas de alguns cromossomos metacêntricos, o que não foi observado nos nossos resultados.

A análise do padrão de heterocromatina constitutiva para a geração Filial apresentou diferenças marcantes quando seus resultados são comparados com o parental *B.hilarii*, uma vez que este demonstrou um total de 10 pares de cromossomos com blocos heterocromáticos enquanto que o produto da hibridação possuiu 11 pares de cromossomos. Além da divergência numérica de cromossomos com marcação banda C positiva, há a diferença de classificação dos cromossomos que apresentam padrão de bandamento C, sendo que *Brycon hilarii* possui três pares de cromossomos metacêntricos, quatro pares de cromossomos submetacêntricos e três pares de cromossomos subteloentríco, ao passo que o produto da hibridação apresenta dois pares de cromossomos metacêntricos, quatro pares de cromossomos submetacêntricos e cinco pares de cromossomos subteloentrícos, dados semelhantes ao parental *B.amazonicus*, ratificando assim, que esta geração Filial é uma linhagem ginogenética.

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram inicialmente descritas por Heitz (1931) e McClintock (1934) e desde então é considerada uma ferramenta útil na análise citogenética.

Margarido & Galetti Jr., (1996, 1999); Almeida-Toledo, (1996) e Wasko, (2000), demonstraram que através da impregnação do nitrato de Prata em espécies do gênero *Brycon*, a região organizadora de nucléolo está presente em apenas um par cromossômico submetacêntrico. Diferentemente destes, este estudo evidenciou que a região organizadora de nucléolo está presente na região telomérica dos braços longos de um par de cromossomos subteloentrícos, dado obtido também por Mariguela et al. (2010) em seus estudos com a espécie *Brycon amazonicus*. As divergências dos resultados obtidos em relação ao tipo de cromossomo portador da NOR parecem estar associada na dificuldade em se classificar os cromossomos em submetacêntricos e subteloentrícos, uma vez que essa classificação irá depender do grau de condensação cromossômica da metáfase analisada.

A presença de NORs localizadas e conservadas em um único par de cromossomos é uma característica comum de todas as espécies do gênero *Brycon* estudadas até o momento e pode ser considerado um caráter primitivo para a subfamília Briconinae (Wasko, 2000). No entanto, a coloração pelo nitrato de Prata detecta apenas as NORs ativas, uma vez que o material corado não é o DNAr, mas sim o conjunto de proteínas ácidas, as quais estão envolvidas no processo de produção dos ribossomos (Howell, 1977; Jordan, 1987). Já a coloração com fluorocromos GC-específicos (MM, CMA₃), cora tanto NORs ativas como inativas em peixes e anfíbios (Mayr et al., 1986; Schmid & Guttenbach, 1988; Philips & Hartley, 1988), provavelmente como

consequência do maior conteúdo G-C do DNAr (Schmid & Guttenbach, 1988), embora estes possam também evidenciar outras regiões cromossômicas. Assim, a aplicação de fluorocromos GC-específicos (CMA₃) confirmou os dados obtidos pela técnica de impregnação por nitrato de Prata, evidenciando regiões ricas em G-C em um par de cromossomos subtelocêntricos, em sua porção telomérica de ambos os braços longos para as espécies parentais e para a geração filial.

No entanto, devido ao fato da aplicação de fluorocromos específicos (CMA₃) detectar regiões ricas em ligações G-C, a aplicação desta técnica evidencia não apenas as regiões organizadoras de nucléolos, mas também, pode identificar diversas outras regiões que não as da NORs.

Para que seja evidenciada a localização das regiões organizadoras de nucléolos, tanto as regiões detectadas pela técnica de impregnação pelo nitrato de Prata, quanto às regiões inativas que não são detectadas pela Ag-NOR nas espécies estudadas neste trabalho, foi necessário a utilização de uma técnica mais eficaz. Portanto, a localização das NORs tem sido comprovada através da hibridação *in situ* isotópica e não-isotópica de sondas de RNAr e DNAr 18S e 28S em cromossomos fixados de vários vertebrados (Long & David, 1980, para revisão).

A técnica de FISH com sondas de rDNA 18S aplicados nos cromossomos das espécies *Brycon hilarii*, *Brycon amazonicus* e o produto da hibridação evidenciaram sinais em um único par de cromossomos, na mesma posição e cromossomo das NORs anteriormente detectadas usando a técnica Ag-NOR e CMA₃.

Resultados semelhantes foram encontrados comparando os estudos com nitrato de Prata (Margarido & Galetti Jr., 1996) e FISH com sonda de rDNA 18S (Wasko & Galetti Jr., 2000), com a ocorrência de dois sítios portadores do cístron ribossômico 18S localizados na extremidade do braço longo de um grande par cromossômico submetacêntrico em todas as espécies de *Brycon* analisadas. Neste trabalho, a única diferença com os dados descritos na literatura, é o fato da região organizadora de nucléolo, da região rica em GC (CMA₃) e da região detentora do cístron ribossômico 18S encontrar-se em um cromossomo subteloentrico, corroborando com dados obtidos por Mariguela et al. (2010).

A técnica de FISH também pode revelar a presença de sinais adicionais na posição intersticial dos cromossomos portadores da NORs, fato que foi comprovado por Mariguela et al. (2010), e que por outro lado contrasta com os resultados descritos por Wasko & Galetti Jr. (2000) e com os resultados deste trabalho, os quais não denotaram nenhuma diferença entre a região do cístron ribossômico 18S e a região da NORs. No entanto, a técnica de FISH usando a sonda para o DNAr 18S pode identificar um número maior de cístrons ribossômicos quando comparada com a técnica Ag-NOR em diversas espécies de peixes, tais como *Salmo trutta* Linnaeus, 1758 (Pendas et al., 1993), *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Ferro et al., 2001), *Hyphessobrycon anisitsi* (Eigenmann, 1907) (Centofante et al., 2003), *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Jesus & Moreira-Filho, 2003), *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) e seus híbridos interespecíficos (Nirchio et al., 2003), *Lebias fasciata* Valenciennes, 1821 (Tigano et al., 2004) e *Triporthus venezuelensis* Spix, 1829 (Nirchio et al.,

2007). Estes sinais a mais podem representar regiões cromossômicas com NORs que normalmente não são expressas, tendo como possível causa a metilação do DNA e o silenciamento de genes relacionados a efeitos posicionais induzidos pela heterocromatina (bandas C) e/ou telômeros, como sugerido por Guillén et al. (2004), (*apud* Mariguela et al., 2010).

Neste estudo foi demonstrado que os sítios de DNAr 5S apresentaram-se em diferentes localizações cromossômicas quando comparados com as informações obtidas para DNAr 18S. O parental *Brycon amazonicus* e o produto da hibridação apresentaram a mesma localização cromossômica do sítio ribossômico DNAr 5S, ambos diferindo da localização do DNAr 5S do parental *Brycon hilarii*, o que sugere que a geração filial é ginogênica, ou seja, apresentam dois lotes cromossômicos haplóides provenientes do parental materno, *Brycon amazonicus*.

O DNAr 5S consiste de uma sequência codificante altamente conservada de 120 pares de bases e de um DNA flanqueador não transcrito (NTS). Wasko & Galetti Jr. (2001), em seus estudos com sete espécies do gênero *Brycon*, não identificaram nenhum polimorfismo tanto de tamanho quanto de intensidade dos sinais fluorescentes para as espécies analisadas. Porém, observaram que das sete espécies, apenas *Brycon insignis* apresentou-se possuidor de dois pares cromossômicos portadores do cístron ribossômico 5S, fato observado em algumas espécies de anfíbios (Vitelli et al., 1982; Schmid et al., 1987; Lucchini et al., 1993), e de peixes, provavelmente o que ocorre no gênero *Brycon* (Wasko et al., 2001). Ainda, Wasko et al. (2001), através de seus estudos com o DNA flanqueador do cístron ribossômico 5S, propõe que as espécies *B.insignis*, *B.lundii*, *B.orbignyanus* e *B.microlepis*

(espécie sinônimo de *Brycon hilarii*) podem apresentar-se possuidores de dois pares cromossômicos portadores do cístron ribossômico 5S, onde o loco maior deve estar localizado em um par de cromossomos submetacêntricos pequenos, enquanto o loco menor deve estar presente em um par de submetacêntricos médios. Já para as espécies *Brycon cephalus* (espécie sinônimo de *Brycon amazonicus*), *Brycon* sp. e *Brycon breviceuda*, o loco maior foi localizado em um par de cromossomos submetacêntricos médios e o loco menor poderia estar localizado em um par de cromossomos submetacêntricos pequenos, uma vez que não puderam ser observados. Os dados apresentados por estes autores revelaram que os genes RNAr 5S são altamente conservados, especificamente para as espécies do gênero *Brycon*. Estes dados foram ratificados por Mariguela et al. (2010) em seus estudos com a espécie *Brycon amazonicus*, a qual localizou além do par portador desse cístron ribossômico, outros sinais intersticiais do gene, ratificando as proposições efetuadas por Wasko et al. (2001). No entanto, neste trabalho, foi possível evidenciar apenas um par de cromossomos submetacêntricos portador do cístron ribossômico 5S para a espécie parental *Brycon amazonicus*, corroborando com os dados obtidos por Wasko et al. (2001). Os mesmos resultados obtidos para o parental *Brycon amazonicus*, foram apresentados para a geração Filial, reforçando assim sua herança genética estritamente materna, ou seja, uma geração ginogênica.

Contudo, a localização do DNAr 5S para a espécie parental *Brycon hilarii* difere dos dados literários obtidos até o momento e da espécie parental *Brycon amazonicus* e a respectiva geração Filial. Foi possível observar uma marcação centromérica em um pequeno par de cromossomos metacêntricos,

nos levando a crer que este poderia ser o “par de cromossomos submetacêntrico pequeno” dito por Wasko & Galetti Jr., (2001) e que a divergência de classificação seja mais uma vez em razão do grau de condensação cromossômica.

É possível ainda observar que todos os locos de DNAr 5S foram coincidentes com regiões heterocromáticas, anteriormente caracterizadas através de bandamento C, descritos nesse trabalho, ao contrário do que ocorre com o DNAr 18S, os locos de DNAr 5S não estão presentes nas regiões organizadoras de nucléolos.

Desta maneira, todos os resultados apresentados nesse trabalho indicam que a geração Filial apresentou características semelhantes ao parental *Brycon amazonicus* e bem distintas quando comparado com o parental *Brycon hilarii*. Assim, o padrão encontrado no possível híbrido sugere a ocorrência de ginogênese, uma forma de herança inteiramente maternal, que consiste na estimulação do desenvolvimento de um ovo por um espermatozoide geneticamente inativado e posterior diploidização pela retenção do 2º corpúsculo polar, ou pelo bloqueio da primeira clivagem (Arai, 2001). Em peixes, a ocorrência de ginogênese natural tem sido encontrada em poucas espécies, incluindo *Poecilia formosa* (Hubbs & Hubbs, 1932), *Poeciliopsis monacha-lucida*, *Poeciliopsis monacha-lucida-occidentalis* (Climino, 1972), *Carassius auratus langsdorfii* (Kobayashi et al., 1977), *Carassius auratus gibelio* (Cherfas, 1981; Jiang et al., 1983), *Menidia Clark hubbsi* (Anthony & Mosier, 1982) e *Phoxinus eos-neogaeus* (Goddard et al., 1998).

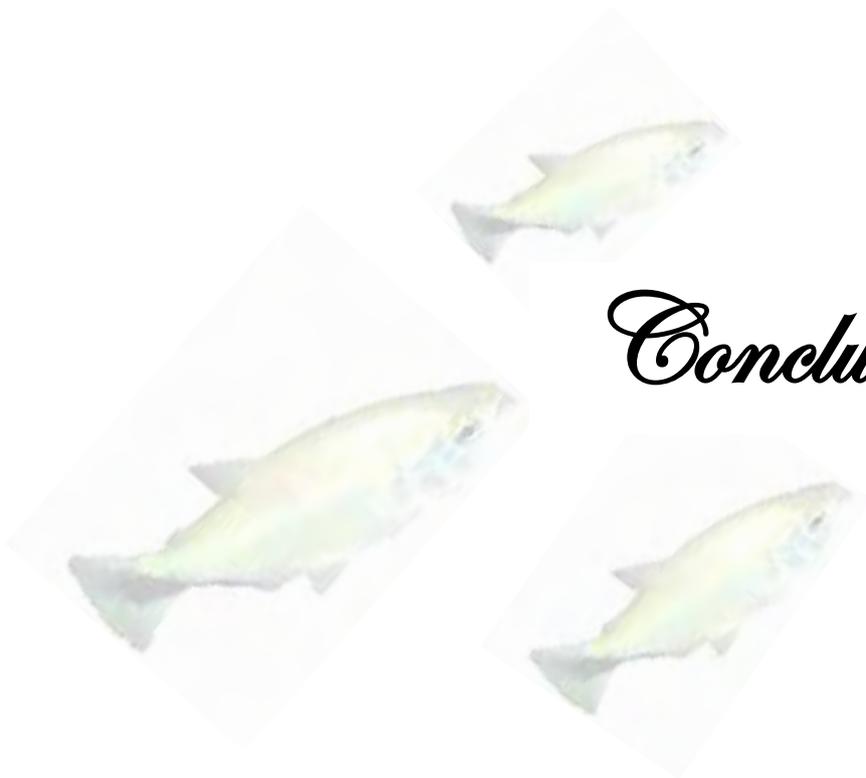
Atualmente existem disponíveis algumas metodologias para a indução artificial de produtos ginogenéticos através da inativação do genoma paterno e a diploidização por agentes físicos ou químicos do material genético da fêmea, pela retenção do 2º corpúsculo polar no zigoto, ou pelo bloqueio da primeira clivagem (Ihssen et al., 1990; Thorgaard, 1992). Além do mais, outra maneira também efetivamente utilizada na produção de ginogenéticos é o uso de sêmen de espécies não relacionadas sendo que geralmente, nos peixes que se reproduzem naturalmente por ginogênese (aloginogênese), os espermatozoides de espécies não relacionadas ativam o ovo, porém não contribuem geneticamente para a formação do embrião (Arai, 2001), podendo ser essa uma hipótese para o resultado relatado no presente estudo do produto da hibridação interespecífica, em que foi empregado o sêmen da Piraputanga (*Brycon hilarii*) para a ativação dos óvulos da Matrinxã (*Brycon amazonicus*), sem que haja incorporação do material genético da espécie paterna *Brycon hilarii*, confirmado pelos resultados obtidos através da análise do cariótipo dos parentais e seu produto da geração F1.

Almeida-Toledo (1996) relata um caso artificial de um cruzamento entre o híbrido macho “tambacu”, que apresenta infertilidade, com a parental fêmea *Piaractus mesopotamicus*, resultando em um produto possivelmente ginogenético, uma vez que não foi possível identificar nenhum padrão de bandamento cromossômico distinto entre o produto da hibridação, nomeado de “pacucu” e a parental fêmea *Piaractus mesopotamicus*, enquanto que apresentou divergências de heterocromatina constitutiva em relação a seu parental híbrido masculino “tambacu”. Nesse mesmo trabalho, Almeida-Toledo, (1996), sugere que o “pacucu” é produto da inativação do genoma paterno e a

diploidização do material genético da fêmea, pela retenção do 2º corpúsculo polar no zigoto.

Ainda, Tabata, (2008), cita que para a espécie truta arco-íris, a ginogênese pode ser utilizada para a produção de populações monoss sexuadas femininas. Entretanto, os indivíduos ginogenéticos, por serem de herança exclusivamente materna, apresentam maior consanguinidade, não sendo, portanto, desejáveis para o cultivo. Além disso, a produção de ginogenéticos em escala comercial é ainda impraticável, devido à alta mortalidade resultante do tratamento (Tabata, 2004).

Para o gênero *Brycon*, especificamente, para as espécies parentais estudadas neste trabalho, não há nenhum dado a respeito de seu processo de hibridação, sendo necessário o desenvolvimento estudos básicos e conseqüentemente mais aprofundados das respostas fisiológicas, nutricionais, imunológicas e reprodutivas, desses animais assegurando a proteção das espécies selvagens.



Conclusão

5 CONCLUSÃO

Os resultados das análises citogenéticas realizadas em exemplares das espécies de peixes *Brycon amazonicus* (Matrinxã), *Brycon hilarii* (Piraputanga) bem como a geração Filial permitiram concluir que:

1. As espécies parentais e a geração Filial mantiveram uma característica peculiar do gênero, ou seja, a presença de um par de cromossomos metacêntrico o qual é significativamente maior que os demais cromossomos do complemento padrão e uma estabilidade cromossômica quanto a sua ploidia.
2. A fórmula cariotípica apresentada para as espécies *Brycon amazonicus* (Matrinxã) ($6m+9sm+10st$) e *Brycon hilarii* (Piraputanga) ($10m+9sm+6st$) diferem de todos os dados encontrados na literatura. Ainda, a fórmula cariotípica de parental *Brycon amazonicus* e da geral Filial são homólogas, sugerindo a ocorrência de ginogênese;
3. O padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva para as espécies parentais foram distintas, podendo este ser um marcador espécie-específica. Ainda, a espécie parental *B.hilarii* apresentou um padrão de bandamento C distinto dos dados da literatura existente. No entanto, a análise do padrão de bandamento C para a geração Filial apresentou diferenças marcantes quando seus resultados são comparados com o parental *B.hilarii*, e homologia quando comparado com os dados obtidos para o parental *Brycon amazonicus*, reforçando a hipótese da geração Filial ser um produto ginogenético;

4. A localização das Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs), foi ratificada pela aplicação de fluorocromos específicos (CMA₃) e pela técnica de FISH com sondas de DNAr 18S, as quais evidenciaram uma marcação telomérica em um par de cromossomos subtelocêntricos em todas as espécies estudadas.

5. A aplicação da técnica de FISH com sondas DNAr 5S evidenciou marcações semelhantes para *Brycon amazonicus* e sua respectiva geração Filial, as quais diferem da marcação obtida para a espécie parental *B.hilarii*. Ainda, a localização do cístron ribossômico 5S para a *B.hilarii* difere dos dados literários existentes, sendo este o primeiro trabalho a confirmar sua localização em um pequeno par de cromossomos metacêntricos.

6. Por fim, todos os resultados apresentados nesse trabalho indicam que a geração Filial apresentou características semelhantes ao parental *Brycon amazonicus* e bem distintas do parental *Brycon hilarii*. Assim, o padrão encontrado no possível híbrido sugere a ocorrência de ginogênese, onde o sêmen da Piraputanga (*Brycon hilarii*) foi empregado apenas para a ativação dos óvulos da Matrinxã (*Brycon amazonicus*), sem que houvesse incorporação de seu material genético.



*Referências
Bibliográficas*

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abuín, M; Clably, C; Martínez, P. (1996). A NOR-associated repetitive element present in the genome of two *Salmo* species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). **Genome**, v.39, p.671-679.

Agostinho, AA; Gomes, LC; Pelicice, FM. (2007). Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá, **EDUEM**, 501 p.

Agostinho, AA; Vazzoler, AE; Gomes, LC. (1993). Estratificación espacial y comportamental de *Prochilodus scrofa* em distintas fases del ciclo de vida, em planície de inundación del alto río Paraná y embalses de Itaipu, Paraná, Brasil. **Revue Hydrobiol. Trop**, v. 26, p. 79-90.

Aguirre, B. (1989). Pré-Diagnóstico da Aquicultura no Sudeste e Sul do Brasil, **Relatório à FAO**, Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas- USP, São Paulo.

Allendorf, FW; Leary, RF; Spruell, P; Wenburg, JK. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology & Evolution**, 16. v.11, p.613-622.

Allendorf, FW; Waples, RS. (1996). Conservation and genetics of salmonid fishes. In: Avise JC e Hamrick JL (eds.), **Conservation Genetics: Case Histories from Nature**. Chapman and Hall, New York, USA, p.238-280.

Almeida-Toledo, LF; Bigoni, APV; Bernadino, G; Toledo-Filho, AS. (1995) Chromosomal location of NORs and Bands in F1 hybrids of bighead carp and silver carp reared in Brasil. **Aquaculture**, v.135, p.227-284.

Almeida-Toledo, LF; Foresti, F; Toledo, SA; Bernardino, G; Ferrari, W; Alcantara, RCG. (1987). Cytogenetic studies of *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their interespecific hybrid. **Selection, hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture**, v.1, p.189-195.

Almeida-Toledo, LF; Stocker, AJ; Foresti, F. (1996). Fluorescence in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). **Chrom Res.**, v.4, p. 301-305.

Anthony, AE; Mosier, DT. (1982). *Menidia clarkhbbsi* (Pisces: Antherinidae), an all female species. **Copeia**, v.3, p.533–540.

Antunes, RSP; Gomes, VN; Prioli, SMAP; Prioli, RA; Julio Jr., HF; Prioli, LM; Agostinho, CS; Prioli, AJ. (2010). Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.9, nº.2, p.674-684.

- Arai, K. (2001). Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. **Aquaculture**, v.197, p. 205-228.
- Arbeláez-Rojas, GA. (2007). Efeitos da natação sustentada no crescimento, na densidade de estocagem e na composição corporal em juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*. Aspectos adaptativos e respostas metabólicas. 149f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, Brasil.
- Arias, CJA. (2002). Biología reproductiva del yamú *Brycon siebenthalae* (Teleostei, Characidae) en cautiverio. Tesis de doctorado, Universidad del Valle, Cali, 112p.
- Arnold, ML; Hodges, SA. (1995). Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? **Tree**, v.10, n^o.2, p.67-71.
- Azevedo, P. (1972). Principais peixes das águas interiores de S. Paulo – hábitos de vida. In: **Poluição e piscicultura**. Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, CIBPU, São Paulo, 216p.
- Arthington, AH; Welcomme, RL. (1995). The condition of large river systems of the world. In: Condition of the World's Aquatic Habitats. Eds: Armantrout, NB; Wolotira, JR; Lebanon, RJ, New Hampshire: World Fisheries Congress, **Science Publishers**, p. 44-75.
- Avault, JW. (1996). Fundamentals of Aquaculture: a step by step guide to commercial aquaculture. Baton Rouge: AVI Publishing Co.
- Baras, E; Ndao, M; Maxi, MYJ; Jeandrain, D; Thomé, JP; Vandewalles, P; Mélard, C. (2000). Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions. I. Ontogeny, dynamics, bioenergetics of cannibalism and prey size selectivity. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1001-1020.
- Barthem, RB. (1990). Ecologia e pesca da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*). Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Bartley, DM; Rana, K; Immink, AJ. (2001). The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. Reviews in **Fish Biology and Fisheries**, v.10, p.325-337.
- Bernardino, G; Mendonça, JOJ; Ribeiro, LP; Alcantara, RCG; Ferrari, VA; Fijan, N. (1986). Primeira reprodução do tambacu; um híbrido do gênero *Colossoma*. In: Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma*. (Projeto 143 Aqüicultura/Brasil 3-7-76-0001-CIID), CEPTA, Pirassununga: 11-12.
- Bonetto, AA; Ezcurra, ID. (1963). Investigaciones sobre migraciones de los peces em los rios de La cuenca del Plata. **Ciência y Investigación**, v.12, p.26.

- Bonetto, AA; Castello, HP. (1985). Pesca y piscicultura en águas continentales de América Latina. Secretaría General OEA. *Monografía* N°31 pp. 119.
- Born, GG; Bertollo, LAC. (2000). Na XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus* with a polymorphic NOR bearing X chromosome. **Chrom. Res.**, v.8, p.111-118.
- Brandão, FR; Gomes, LC; Chagas, LDA; Silva, ALF. (2005). Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.40, n°3, p.299-303.
- Brassesco, MS; Pastoril, MC; Roncati, HÁ; Fenocchio, AS. (2004). Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Parana River (Argentina). **Gen. Mol. Res.**, v.3, p.293-301.
- Brinn, MNA; Porto, JIR; Feldberg, E. (2004). Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. **Hereditas**, v.141, p.252-257.
- Britski, HA. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. *In*: Poluição e Piscicultura. Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, São Paulo, p.79-108.
- Britski, HA. (1992). Conhecimento atual das relações filogenéticas de peixes neotropicais, pp. 106-120. *In*: A. A. Agostinho & E. Benedito-Cecilio (ed.), Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil. **Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia**, Editora da UEM, Maringá.
- Britski, HA; Sato, Y; Rosa, ABS. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. (3ªed.). **CODEVASF**, Brasília, p.115.
- Britski, HA; Silimon, KZS; Lopes, BS. (1999). Peixes do Pantanal. Manual de identificação. Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: **Embrapa-CPAP**, 184p.
- Buckup, PA. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). pp.123-144. *In*: Malabarba, LR; Reis, RE; Vari, RP; Lucena, ZM; Lucena, CAS. (eds.), *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre. 603p.
- Buckup, PA; Menezes, NA. (eds.). (2003). Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil, 2ª ed. Disponível em <http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo/> (acessado em 06 de Janeiro de 2011).
- Buckup, PA; Menezes, NA & Ghazzi, MS (eds.). (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Camargo, SGO; Pouey, JLOF. (2005). Aquicultura – Um mercado em expansão. **Ver. Bras. Agrociências**. Pelotas, v.11, n.4, p.393-396.

- Cambray, JA. (2003). The need for research and monitoring on the impacts of translocated sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*, in South Africa. **African Journal of Aquatic Science**, v.28, p.191-195.
- Campton, DE; (1987) Natural hybridization and introgression in fishes: Methods of 144 detection and genetic interpretations. In: Ryman N e Utter F (eds.), **Population Genetics and Fishery Management**. University of Washington Press, Seattle, USA, p.161-192.
- Casal, CMV. (2006). Global documentation of fish introductions: The growing crisis and recommendations for action. **Biological Invasions**, n^o. 8, p.3-11.
- Castro, J; Viñas, A; Sánchez, L; Martínez, P. (1996). Characterization of an atypical NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*) with Ag- and CMA₃-staining, and fluorescent in situ hybridization. **Cytogenet. Cell Genet.** v.75, p.234-239.
- Ceccarelli, PS; Senhorini, JA; Volpato, GL. (2000). Dicas de piscicultura: perguntas & respostas. Botucatu: Santana, 247p.
- Centofante, L; Bertollo, LAC; Miyazawa, CS; Moreira-Filho, O. (2003). Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetragonopterinae). **Cytologia**, v.68, n^o.3, p.283-288.
- Cherfas, NB. (1981). Gynogenesis in fishes. In: Kirpichnikov VS, (ed.). **Genetic Bases of Fish Selection**, Springer-Verlag, Berlin, p 255–273.
- Chevassus, B. (1983) Hybridization in fish. **Aquaculture**, v.33, p.254-262.
- Climino, MC. (1972) Meiosis in triploid all-female fish (*Poeciliopsis*, Poeciliidae). **Science**, v.175, p.1484–1486.
- Coblentz, BE. (1990). Exotic organisms: A dilemma for conservation biology. **Conservation Biology**, n^o.4, p.261-265.
- Cole, CJ; Leavens, CR. (1971). Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetol**, v.49, p.102.
- Collares-Pereira, MJ; Cowx, IG. (2004). The role of catchment scale environmental management in freshwater fish conservation. **Fisheries Management and Ecology**, v.11, p.303-312.
- Costa, CC; Ribeiro, RS; Silva, RL; Telles, MPC; Silva Jr., NJ. (2008). Diversidade ictiofaunística e compartimentação do rio Caiapó, Goiás. **Estudos, Goiânia**, v.35, n^o. 11/12, p. 1023-1054.
- Cowx, IG. (2002). Analysis of threats to freshwater fish conservation: Past and present challenges. In: MJ, Collares-Pereira; IG, Cowx; MM, Coelho (eds.), Conservation of freshwater fishes: Options for the future Oxford, **Blackwell Science**, p.201-220.

Daniel-Silva, MFZ. (2001). Análises citogenéticas comparativas em Characidae (Pisces, Characiformes). *Doctoral Thesis*, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brazil.

Dingle, H. (1996). **Migration: The biology of Life on the Move**. New York: Oxford University Press, p.480.

Drouin, G; Moniz de Sá, M. (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, p.481-493.

Eschmeyer, WN; Fricke, R. (ed.). (2009). Catalog of Fishes. Electronic Database accessible at <http://research.calacademy.org/ichthyology/>. *Apud*: Mirande, JM. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v.8, n°3, p.385-568.

Falcão, JN; Bertollo, LAC. (1985). Chromosome characterization in Acestrorhynchinae and Cynopotaminae (Pisces, Characidae). **J Fish Biol**, v.27, p.603–610.

FAO. (1997). Review of the State of World Aquaculture. FAO Fisheries Circular N°886, Rev. 1. Rome, Italy.

FAO. (2006). State of World Aquaculture. Rome. 145p. (Fisheries Technical Paper 500).

FAO. (2007). Fisheries and Aquaculture Department. The State of world fisheries and aquaculture (SOFIA) 2006. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome, 180 pp.

FAO. (2010). The State of world fisheries and aquaculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome, 167pp.

Fauaz, G; Vicente, V; Moreira-Filho, O. (1994). Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.157-163.

Feldberg, E; Porto, JIR; Bertollo, LAC. (1992). Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) os the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. **Brazil. J. Genet.**, v.15, n°2, p.369-383.

Ferro, DAM; Néo, DM; Moreira-Filho, O; Bertollo, LAC. (2001). Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. **Genetica**, v.110, p.55-62.

Filho, EZ; Reynalte-Tataje, D; Weingartner, M. (2006). Potencialidad Del gênero Brycon em la piscicultura brasileira. **Ver. Colombiana de Ciências Pecuárias**, v.19, nº.2.

Fink, SV & Fink, WL. (1981). Interrelationships of the Ostariophysian fishes (Teleostei). **Zool. J. Linnean Society**, v.72, p.297-353.

Foresti, F; Almeida-Toledo, LF; Toledo-Filho, SA. (1981). Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. **Cytogenet Cell Genet**, v. 31, p.137-144.
Foresti, F. (2000). Biotechnology and fish culture. **Hydrobiologia**, v.420, p. 45–47.

Foresti, F; Senhorini, JA ; Almeida-Toledo LF; Oliveira, C; Porto-Foresti, F; Silva, MFZ; Calcagnoto, D. (2007) . Análise Citogenética e Genético-molecular das populações de *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon hilarii*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus lineatus* e *Leporinus macrocephalus* dos rios Miranda, Aquidauana, Paraguai (MS), Cuiabá/Manso e do Pantanal. *In: Cleide Passos. (Org.)*. Pesquisas Patológicas e Genéticas em Recursos Pequeiros da Bacia do Alto Paraguai. Brasília, DF: Ed. IBAMA, p. 125-169.

Froese, R; Pauly, D. (2007). FishBase. Available at: <http://www.fishbase.org>.; accessed on 2007/08/15.

Frost, DR; Grant, T; Faivovich, J; Bain, RH; Haas, A; Haddad, CFB; De Sá, RO; Channing, A; Wilkinson, M; Donnellan, SC; Raxworthy, CJ; Campbell, JA; Blotto, BL; Moler, P; Drewes, RC; Nussbaum, RA; Lynch, JD; Green, DM & Wheeler, WC. (2006). The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v.297, p.1-370.

Galetti Jr., PM; Bertolo, LAC; Moreira-Filho, O; Ferro, DAM; Dias, AL; Portela, ALBS; Venere, PC. (1984). Levantamento citogenético preliminar em peixes de Três Marias – MG – Bacia do rio São Francisco. *In: Associação Mineira de Aquicultura (AMA). Resumos. Coletânea 1982-1987*, p.55.

Géry, J & de Rham, P. (1981). Um nouveau Poissin characidé endémique Du bassin Du Rio Tumbés au nord du Pérou, *Chilobrycon deuterodon* n. g. SP. (Characoidei). **Rev. Fr Aquariol**, nº.8, p.7-12.

Gherardi, F. (2007). Biological invasions in inland waters: An overview. *In: F. Gherardi (ed.)*, Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. 2a ed., New York, Springer, Book Series Invading Nature -Springer Series in Invasion Ecology, p. 3-25.

Goddard, KA; Megwinoff, O; Wessner, LL; Giaimo, F. (1998). Confirmation of gynogenesis in *Phoxinus eos-neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). **J Hered.**, v.89, p.151–157.

Godinho, AL; Kynard, B; Godinho, HP. (2007). Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São

- Francisco river, Brazil. **Environ Biol Fish**, v.80, n.º.4, p.421-433. doi: 10.1007/s10641-006-9141-1.
- Godinho, AL; Pompeu, PS. (2003). A importância dos ribeirões para os peixes de piracema. *In*: Godinho AL. (Org). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, p. 361-372.
- Godinho, HP. (2007). Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.351-360.
- Godoy, MP. (1964). Notas sobre peixes. Pirassununga: Instituto de Zootecnia e Indústrias Pecuárias Fernando Costa. 73 p.
- Godoy, MP. (1975). **Peixes do Brasil**. Piracicaba: Franciscana, 4v.
- Gold, JR; Li, YC; Shipley, NS; Powers, PK. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **J. Fish. Biol.**, v.37, p.563-575.
- Gornung, E; Gabrielli, I; Cataudella, S; Sola, L. (1997). CMA₃-banding pattern and fluorescence in situ hybridization with 18S rRNA genes in zebrafish chromosomes. **Chromosome Res.**, v.5, p.40-46.
- Goulding, M. (1979). Ecologia da Pesca no rio Madeira. Manaus, CNPq/INPA, 172p.
- Goulding, M. (1980). The fishes and the forest. Explorations in Amazonian natural history. Berkeley, University of California Press, 280p.
- Guevara, SLP; Castellanos, JAA; Casallas, PEC. (2003). Caracterización cariotípica del yamú (*Brycon sienbenyhalae*). **Orinoquia**, v.7, n.º.1-2, p.42-46.
- Guillén, AKZ; Hirai, Y; Tanoue, T; Hirai, H. (2004). Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. **Chromos. Res.**, v.12, p.225-237.
- Gurgel, JJS. (1981). O DNOCS e a piscicultura. DNOCS. 35 p.
- Hackbarth, A; Moraes, G. (2006). Biochemical responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) after sustained swimming. **Aquaculture Research**, v.37, p.1070-1078.
- Hashimoto, DT; Mendonça, FF; Senhorini, JÁ; Bortolozzi, J; Oliveira, C; Foresti, F; Porto-Foresti, F. (2009c). Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture**, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.015.

- Heitz, E. (1931). Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Grösse pflanzlicher Nukleolen. **Planta**, v.12, pp. 775-844.
- Howell, WM. (1977). Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, v.62, p.361-367.
- Howell, WM; Black, DA. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015.
- Howes, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.)*. **Zool.**, n^o.43, p.1-47.
- Hubbs, CL. (1955). Hybridization between fish species in nature. **Syst. Zool.**, v.4, p.1–20. doi:10.2307/2411933.
- Hubbs, CL; Hubbs, LC. (1932). Apparent parthenogenesis in nature, in a form of fish of hybrid origin. **Science**, v.76, p.628–630.
- Hulata, G. (2001). Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genética**, v.111, p.155–173.
- Huet, M. (1970). **Traité de pisciculture**. 4. ed. Bruxelles: Éditions CH. DE WYNGAERT. 718 p.
- IBAMA (2005) Estatística da pesca 2004: Brasil – grandes regiões e unidades da federação. Brasília – DF, p.98.
- IBAMA (2007). Estatísticas da pesca 2005 – Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, p.147.
- Ihssen, PE; McKay, LR; McMillan, I; Phillips, RB. (1990). Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.119, p. 698–717.
- Jesus, CM; Moreira-Filho, O. (2003). Chromosomal location of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Caryologia**, v.56, n^o.3, p.281- 287.
- Jiang, YG; Yu, HX; Chen, BD; Liang, SC. (1983). Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio*. **Acta Hydrobiol Sinica**, v.8, p.1–13.
- Jordan, G. (1987). At the heart of the nucleolus. **Natures**, v.329, p.489-490.
- Kang, JH; Lee, SJ; Park, SR; Ryu, HY. (2002). DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v.68, n^o.3, p.494-498.

- Kantek, DLZ; Noleto, RB; Fenocchio, AS; Cestari, MM. (2007). Cytotaxonomy, heterochromatic polymorphism and natural triploidy of a species of *Astyanax* (Pisces, Characidae) endemic to the Iguçu river basin. **Braz. arch. biol. technol.** [online]. vol.50, n^o.1, pp. 67-74. ISSN 1516-8913.
- Kobayashi, H; Nakans, K; Nakamura, M. (1977). On the hybrids, 4ng inbuna (*C. auratus langsdorfi*) × kinbuna (*C.auratus subsp.*) and their chromosome. Bull Jpn. **Soc Sci Fish.**, v.43, p.31–37.
- Komen, H; Thorgaard, GH. (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fish: A review. **Aquaculture**, v.269, p.150-173.
- Landau, M. (1992). **Introduction to Aquaculture**. New York: John Wiley & Sons.
- Larinier, M. (2001). Environmental Issues, Dams and Fish Migration. *In*: Marmulla, G. (ed). **Dams, fish and fisheries: Opportunities, challenges and conflict resolution**. FAO Fisheries Technical Paper, p.45-89.
- Lee, MR; Elder, FFB. (1980). Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogen. Cell Genet.**, v.26, p.36-40.
- Leprieur, F; Beauchard, O; Blanchet, S; Oberdorff, T; Brosse, S. (2008). Fish invasions in the world's river systems: When natural processes are blurred by human activities. **PLoS Biology**, v.6, n^o.2, p.28. doi:10.1371/journal.pbio.0060028
- Levan, A; Fredga, K; Sandberg, AA. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, n^o.52, p.201-220.
- Lima, FCT. (2003). Characidae – Bryconidae (Characins, tetras), p.174-181. *In*: Reis, RE; Kullander, SO; Ferraris Jr, CJ. (Eds). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.742.
- Lima, FCT; Castro, RMC. (2000). *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v.11, n^o.2, p.155-162.
- Long, EO; David, ID. (1980). Repeated genes in eukaryotes. **Ann Rev Biochem.**, v.49, p.727-764.
- López, DD; Palacio, GV; Cortés, TR; Angel, MO. (2008). Caracterización citogenética del pez neotropical *Brycon henni* (Pisces: Characidae). **Rev. Biol. Trop.** (Int. J. Trop. Biol.), v.56, n^o.4, p.1619-1628.
- Lozano, R; Rejon, CR; Rejon, MR. (1988) A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. **Stain Technology**, v.66, n^o.6, p.335-338.

- Lucena, CAS. (1993). Estudo Filogenético da Família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo, SP.
- Luccini, S; Nardi, I; Barsacchi, G; Batistoni, R; Andronico, F. (1993). Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S + 28S and 5S) DNA loci in primitive and advanced urodele amphibians. **Genome**, v.36, p.762-773.
- Maistro, EL. (1991). Caracterização citogenética e morfológica de populações de *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae) das bacias dos rios Tietê e Paranapanema. *Masters thesis*, Departamento de Genética do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.
- Maistro, EL; Oliveira, C; Foresti, F. (1998). Comparative cytogenetic and morphological analysis of *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae). **Genet. Mol. Biol.**, v.21, n^o.2, p.201-206.
- Makinouchi, S. (1980). Criação de carpa (*Cyprinus carpio Lineu*) em água parada. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte. v.6, n^o.67. p.30-49.
- Manosroi, J; Sripalakit, P; Manosroi, A. (2003). Biotransformation of chlormadinone acetate by free and immobilized *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 and *Bacillus sphaericus* ATCC 13805, **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.320-325.
- Margarido, VP; Galetti Jr., PM. (1996). Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). **Cytobios**, v.85, p.219-228.
- Margarido, VP; Galetti JR., PM. (1999). Heterochromatin Patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**. v.22, n^o.3, p.357-361.
- Mariguela, TC; Nirchio, M; Ron, E; Gaviria, JI; Foresti, F; Oliveira, C. (2010). Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) (Teleostei: Characidae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. **Comparative Cytogenetics**, v.4, n^o.2, p.185-193.
- Martínez, J.L., Morán, P., Garcia-Vázquez, E. and Pendás, A.M. (1996). Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the Europeaneel (*Anguilla anguilla*). *Cytogenet. Cell Genet.* 73: 149-152.
- Martínez, P; Vinãs, A; Bousa, C; Arias, J; Amaro, R; Sánchez, L. (1991). Cytogenetical characterization of hatcherystocks and natural populations of Sea and Brown Trout from northwestern Spain. **Heredity**, v.66, p.9-17.
- Martins, C; Galetti Jr., PM. (2001). Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome**, v.44, n^o.5, p.903-910.

Martins, C; Galetti Jr., PM. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chrom. Res.**, v.8, p.353-355.

Martins, C; Galetti Jr., PM. (1998). Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. **Genet. Mol. Biol.**, v.21, p.355-360.

Mayr, B; Rab, P; Kalat, M. (1986). Localisation of NORs and counterstainenhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta* (Pisces, Salmonidae). **Theor. Appl. Genet.**, v.71, p.703-707.

Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

McClintock, B. (1934). The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea Mays*. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v.21, p.294-328.

McLarney, W. (1984). **The Freshwater Aquaculture Book**. Hartley & Marks, Washington.

Mendonça, JOJ; Melo, JSC. (1994). Introdução. I Sem. Sobre Criação de Espécies do Gênero *Brycon*. p.1.

Mirande, JM. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v.8, n°3, p.385-568.

Miyazawa, CS; Galetti Jr., PM. (1994). First cytogenetical studies in *Characidium* species (Pisces, Characiformes, Characidiinae). **Cytologia**, v.59, p.73-79.

Moreira, AB; Visentainer, J; de Souza, JE; Matsushita, M. (2001). Fatty Acids Profile and Cholesterol Contents of Three Brazilian *Brycon* Freshwater Fishes. **J. Food Compos. Anal.**, v.14, p.565-574.

Moreira-Filho, O; Bertollo, LAC. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Rev Bras Genet**, v.14, p.331-358

Morira-Filho, O; Bertollo, LAC; Galetti Jr., PM. (1984). Structure and variability of nucleolar organizer region in *Paradontidae* fish. **Can. J. Genet. Cytol.**, v.26, n°5, p.564-568.

Morelli, S; Bertollo, LAC; Moreira-Filho, O; Foresti, F; Almeida Toledo-Filho, S.(1983). Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). 1. Karyotypic variability. **Caryologia**, v.36, p.235-244.

Müller, J; Troschel, FH. (1844). Synopsis generum et specierum familiae characinarum (Prodromus descriptions novorum generum et specierum). **Archiv. Naturgesch.**, v.10, n°1, p.81-99.

- Nelson, JS. (2006). **Fishes of the world**. 600 p.
- Neville, LE; Murphy, S. (2001). Invasive alien species: Forging cooperation to address a borderless issue. Berks, International Association for Ecology (INTECOL) Newsletter, Spring/Summer, p. 3-7.
- Nirchio, M; Cervigón, F; Porto, JIR; Pérez, JE; Gómez, JA; Villalaz, J. (2003). Karyotype supporting *Mugil curema* Valenciennes, 1836 and *Mugil gaimardianus* Desmarest, 1831 (Mugilidae: Teleostei) as two valid nominal species. **Sci. Mar.**, v.67, n^o.1, p.113-115.
- Nirchio, M; Oliveira, C; Ferreira, IA; Granado, A; Ron, E. (2007). Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the characid fish *Triporthus venezuelensis* (Characiformes, Characidae). **Genet. Mol. Biol.**, v.30, p.25-30.
- Nomura, H. (1982). Criar carpas, ainda um bom negócio. O Estado de São Paulo. Suplemento Agrícola.
- Northcote, TG. (1978). Migratory Strategies and Production in Freshwater Fishes. In: GERKING, SD. (ed). **Ecology of freshwater fish production**. Oxford: Blackwell, p.326-359.
- Northcote, TG. (1984). Mechanisms of fish migration in fishes. In: JD Mcleave (ed) Nato. Conference Series on Marine Sciences, Washington D.C.
- Oliveira, C; Almeida-Toledo, LF; Foresti, F; Toledo-Filho, AS. (1988). Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**, v.41, p.227-236.
- Oliveira, C; Foresti, F; Hilsdorf, AWS. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiol Biochem.**, v.35, p.81-100.
- Orsi, ML; Agostinho, AA. (1999). Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da bacia do rio Paraná, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, n^o.16, p.557-560.
- Padhi BK & Mandal RK. (1997). Inadvertent hybridization in a carp hatchery as detected by nuclear DNA RFLP. **Journal of Fish Biology**, v.50, p.906–909.
- Parada S; Arias, JÁ; Cruz, PE. (2003). Caracterización cariotípica del yamú (*Brycon siebenthalae*). **Revista Orinoquia**, v.7, p.42-46.
- Park, IS; Nam, YK; Douglas, SE; Johnson, SC; Kim, DS. (2003). Genetic characterization, morphometrics and gonad development of induced interspecific hybrids between yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus*(Storer) and winter flounder, *Pleuronectes americanus*(Walbaum). **Aquaculture Research**, v.34, n^o.5, p.389-396.

- Pendás, AM; Moran, P; Freije, JP; Garcia-Vázquez, E. (1994). Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet. Cell Gen.**, v.67, p.31-36.
- Pendás, AM; Morán, P; Garcia-Vázquez, E. (1993a). Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.63, p.128-130.
- Pendás, AM; Morán, P; Garcia-Vázquez, E. (1993b). Multichromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in Brown trout. **Chromos. Res.**, v.1, p.63-67.
- Perry, J.; Vanderklein, E. (1996). Water quality: Management of a natural resource. Bi-ddeford, **Blackwell Science**, Inc. 639 p.
- Philips, RB; Hartley, SE. (1988). Fluorescent banding patterns of the chromosomes of the genus *Salmo*. **Genome**, v.30; p.193-197.
- Pinto Cesar, M; Murgas, LDS; Araujo, RV; Drummond, CD. [2005]. Métodos para obtenção de população monossexo na piscicultura. **Boletim Agropecuário**, Lavras/MG, n.º.69, p.1-27.
- Porto-Foresti, F; Foresti, F. (2004). Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. **TecArt**, São Paulo, 195-215.
- Porto-Foresti, F; Hashimoto, DT; Alves, AL; Almeida, RBC; Bortolozzi, J; Senhorini, JA; Foresti, F. (2008). Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.º.1, p.195-202.
- Porto-Foresti, F; Oliveira, C; Tabata, YA; Rigolino, MG; Foresti, F. (2002) NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Hereditas**, v.136, p.227–230.
- Povh, JA. (2007). Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Tese (Doutorado em Zootecnia)*. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR.
- Povh, JA; Ribeiro, RP; Siro, RN; Streit Jr., DP; Lopera-Barrero, NM; Vargas, L; Gomes, PC; Lopes, TS. (2008). Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.º.2. doi: 10.1590/S0100-204X2008000200007
- Proença, CEM; Bittencourt, PRL. (1994). Manual de Piscicultura Tropical. Brasília: IBAMA, 196 p.

Purdom, CE. (1993). Genetics and fish breeding. Chapman & Hall, Fish.and.Fisheries.Series, v.8, 277p .

Reis, RE; Kullander, SO; Ferraris-JR., CJ. (orgs.). (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre.

Resende, EK; Ribeiro, RP; Legat, AP; Benites, C; (2008). Melhoramento genéticos em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal. 4p. ADM –Artigo de Divulgação na Mídia, n^o.130.

Rhymer, JM; Simberloff, D. (1996). Extinction by hybridization and introgression. Annu. **Rev. Ecol. Syst.**, n^o. 27, p. 83-109.

Oliveira, R. (2009). O Panorama da Aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Rev. Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.2, n.1, p.71-89.

Rocha, YR; Aguiar, JPL; Marinho, HA; Shrimpton, R. (1982). Aspectos nutritivos de alguns peixes da Amazônia. **Acta Amazônica**, v.12, n^o.42, p.787-794.

Rocon-Stange, EA; Almeida-Toledo, LF. (1993). Análise cariotípica nos gêneros *Probolodus* e *Axyanas* (Pisces, Characidae). *I Simpósio de citogenética Evolutiva Aplicada de Peixes Neotropicais*. São Carlos, SP, Brazil, PP.53.

Rodrigues, JAG; Alencar, DB; Pires, KMS; Saboya, JPS; Araujo, GS; Torres, VM; Farias, WRL. (2009). Efeitos dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata* em alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidos a diferentes salinidades. **Rev.Bras.Eng.Pesca**, v.4, n^o.2, p.20-33.

Sabino, J; Andrade, LP. (2003). Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo da região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade ecológica no rio Baía Bonita (Aquário Natural de Bonito). **Biota Neotropica**, São Paulo, v.3, n^o. 2.

Sabino, J; Sazima, I. (1999). Association between fruit eating fish and foraging monkeys in western Brazil. **Ichthyol. Explor. Fres.**, v.10, n^o.4, p.309-312.

Sajdak, SL; Reed, KM; Philips, RB. (1998). Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **J. Mol. Evol.**, v.46, p.680-688.

Sanches, A; Galetti Jr., PM. (2007). Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Braz. J. Biol.**, v.67, n^o.4, p.889-895.

Santos, GM; Ferreira, EJG; Zuanon, JAS (2006). Peixes comerciais de Manaus. Manaus, **IBAMA-AM/ProVarzea**, p.144.

- Senhorini, JA; Alcântara Rocha, RCG; Polaz, CNM; Ponzeto, JM; Foresti, F; Porto-Foresti, F. (2009). Reprodução induzida de híbridos de siluriformes em cativeiro: potencialidades e ameaças à conservação das espécies nativas. **Bol. Tec. CEPTA**, em fase de publicação *apud* Ashikaga, FY; Casimiro, ACR; Kurchevski, G; Almeida, FS & Orsi, ML. (2010). Invasão dos híbridos em águas continentais brasileiras. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v.2, n^o. 38.
- Scheel, JJ. (1973). *Fish chromosomes and their evolution*. Internaço Report of Danmartes Akvarvum, Charlotherlund, Denmark, p.22.
- Scheel, JJ; Simonsen, V; Gyldenholm, AO. (1972). The karyotypes and some electrophoretic patterns of fourteen species of the genus *Corydoras*, *Sonderdruck aus*. **Zool. Syst. Evolutiosforsch**, v.10, p.144-152.
- Schmid, M; Guttenbach, M. (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. **Chromosoma**, v.97, p.101-114.
- Schlosser, IJ. (1995). Critical landscape attributes that influence fish population dynamics in headwater streams. **Hidrobiologia**, v.303, p.71-81.
- Schwartz, FJ. (1981). World literature to fish hybrids, with an analysis by family, species, and hybrid: Suppl. 1. NOAA Tech. Rep. NMFS SSRF-750. U.S. Dept. Comm., p.507.
- Schweizer, D. (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma (Berl.)**, v.58, p.307–324.
- Scribner, KT; Page, KS; Bartron, ML. (2001). Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.10, p.293-323.
- Silva, AW; Azeredo-Espin, AM; Krieger, MH; Krieger, JE. (2002). Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. **Aquaculture**, v.214, p.81-91.
- Silva, NJR. (2005). Dinâmicas de Desenvolvimento da Piscicultura e Políticas Públicas no Vale do Ribeira/SP e Alto Vale do Itajaí/SC. 544 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Centro de Aqüicultura -CAUNESP, Jaboticabal/SP.
- Stempniewski, HL. (1997). Retrospectiva dos serviços de pesca da Secretaria de Agricultura e Abastecimento e o jubileu de prata do Instituto de Pesca. São Paulo: Instituto de Pesca. 161 p.
- Sumner, AT. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Expl. Cell. Res.**, v.75, p.304-306.

Suzuki, H; Sakurai, S; Matsuda, Y. (1996). Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet Cell Genet.**, v.72, p.1-4.

Tabata, YA. (2008). Biotecnologias aplicadas a truticultura. **Rer. Colomb. Cienc. Pecu**, v.21, p.455-522.

Tabata, YA. (2004). Obtenção e desempenho de progênes ginogenéticas meióticas e mitóticas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). *Tese de doutorado*. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Tavares-Dias, M; Frascá-Scorvo, CMD; Campos-Filho, E; Moraes, FR. (1999). Hematological characteristics of Brazilian teleosts. IV. Parameters of matrinxã (*Brycon cephalus*, Günther, 1869). (Osteichthyes: Characidae). **ARS Veterinária**, v.15, n.º.3, p.149-153.

Thorgaard, GH. (1977). Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. **Science** (Washington, D.C.), v.196, p.900–902.

Thorgaard, GH. (1986). Ploidy manipulation and performance. **Aquaculture**, v.126, p.57-64.

Thorgaard, GH. (1992). Application of genetic technologies to rainbow trout. **Aquaculture**, v.100, p. 85–97.

Tigano, C; Rocco, L; Ferrito, V; Costagliola, D; Pappalardo, AM; Stinso, V. (2004). Chromosomal mapping and molecular characterization of ribosomal RNA genes in *Lebias fasciata* (Teleostei, Cyprinodontidae). **Genetica**, v.121, p.95-100.

Toledo-Filho, SA; Almeida-Toledo, LF; Foresti, F; Bernardino, G; Calcagnotto, D. (1994). Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. **Cadernos de Ictiogenética 2**, CCS/USP, São Paulo.

Toledo-Filho, SA; Almeida-Toledo, LF; Foresti, F; Calcagnotto, D; Santos, SBAF; Bernardino, G. (1998). Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. **Cadernos de Ictiogenética 4**, CCS/USP, São Paulo.

Toledo-Filho, SA; Almeida-Toledo, LF; Foresti, F; Galhardo, EE; Donola, E. (1992). Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. **Cadernos de Ictiogenética 1**, CCS/USP, São Paulo.

Toledo-Filho, SA; Foresti, F; Almeida-Toledo, LF. (1996). Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. **Cadernos de Ictiogenética 3**, CCS/USP, São Paulo.

Torres, RA; Matoso, DA & Artoni, RF. (2004). Genética de Peixes Neotropicais. II Biologia Molecular de Peixes Neotropicais. UEPG **Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v.10, n.º. 2, p.27-37.

- Trigo, TC. (2008). Hibridação e introgressão entre espécies de felídeos neotropicais (Mammalia, Carnivora). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.
- Viñas, A; Gómez, C; Martínez, P; Sánchez, L. (1996). Localization of rDNA genes in European eel (*Anguilla anguilla*) by FISH. **Genome**, v.39, p.1220-1223.
- Vitousek, PM; Mooney, HA; Lubchenco, J; Melillo, JM. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. **Science**, v.277, p.494-499.
- Vitule, JRS. (2009). Introduction of fishes in Brazilian continental ecosystems: Review, comments and suggestions for actions against the almost invisible enemy. **Neotropical Biology and Conservation**, v.4, n^o.2, p.111-122.
- Vitule, JRS; Úmbria, SC; Aranha, JMR. (2006a). Introduction of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) into Southern Brazil. **Biological Invasions**, n^o.8, p.677-681.
- Vitule, JRS; Úmbria, SC; Aranha, JMR. (2006b). Introdução de espécies, com ênfase em peixes de ecossistemas continentais. *In*: Monteiro-Filho, ELA; Aranha, JMR. (eds.), Revisões em Zoologia - I: Volume Comemorativo dos 30 Anos do Curso de Pós - Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Paraná, p. 217-229.
- Ward, RD. (2000). Genetics in fisheries management. **Hydrobiologia**, v.420, p.191-201.
- Wasko, AP. (2000). Marcadores cromossômicos e moleculares no gênero *Brycon* (Characidae): uma contribuição à biologia evolutiva e à conservação biológica destes peixes. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal de São Carlos. Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Carlos, SP.
- Wasko, AP; Martins, C; Oliveira, C; Senhorini, JÁ; Foresti, F. (2002). Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **J.Appl.Ichthyol.**, v.20, p.48-52.
- Wasko, AP; Martins, C; Wright, JM; Galetti Jr., PM. (2001). Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome**, v.44, n^o.5, p.893-902.
- Welcomme, RL. (1988). International introductions of inland aquatic species. FAO Fish. **Tech. Pap.**, Roma, v.294, p.1-318.
- Young, WP; Ostberg, CO; Keim, P; Thorgaard, GH. (2001). Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*). **Molecular Ecology**, v.10, p.921–930.

Young, WP; Wheeler, PA; Fields, RD; Thorgaard, GH. (1996). DNA fingerprinting confirms isogeneticity of androgenetically derived rainbow trout lines. **J.Heredity**, v.87; p.77-81 .

Zuntini, D; Vicentin, W; Santos Costa, FE; Marques, SM; Barboza, EG. (2004). Alimentação natural da Piraputanga, *Brycon hilarii* (Teleostei-Characidae) no Rio Miranda, Município de Jardim, MS-Projeto Piracema. IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. *In*: SIMPAN2004.