

UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS BAURU DEPARTAMENTO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mel Ayumi Tamada Silva

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO HÍBRIDO PRODUTO DO CRUZAMENTO ENTRE
Megaleporinus macrocephalus* e *Leporinus friderici

BAURU - 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS - CAMPUS BAURU DEPARTAMENTO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mel Ayumi Tamada Silva

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DO HÍBRIDO PRODUTO DO CRUZAMENTO ENTRE
Megaleporinus macrocephalus* e *Leporinus friderici

Trabalho de conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Ciência Biológicas.

Orientador: Prof. Assoc. Fábio Porto-Foresti



BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Fábio Porto-Foresti

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)

Prof. Assoc. Reginaldo José Donatelli

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)

Doutorando Caio Augusto Gomes Goes

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)

AGRADECIMENTOS

Não posso começar meus agradecimentos sem iniciar por aqueles que fizeram eu ser a pessoa que sou hoje, meus pais, Tiemi e Marcelo, que são minha base. Eu nunca vou conseguir retribuir nem metade das coisas que vocês me proporcionaram e ainda proporcionam, mas pelo menos espero um dia conseguir cuidar de vocês como vocês cuidam de mim. Só nós sabemos o quanto esse final de ano foi complicado para a nossa família, coisas que não estão sob o nosso controle acontecem e mexem demais com a gente. Posso dizer que minha maior felicidade é ter a oportunidade de estar escrevendo para vocês dois nesse momento e saber que em fevereiro estarei vendo vocês dois na plateia de minha colação. Estou esperando ansiosamente por isso. Vou me formar e podem ter certeza de que se não fosse o apoio e suporte para seguir meus sonhos que vocês sempre deram eu não estaria aqui nesse momento. Sei que estão orgulhosos de mim, pois isso vocês não escondem de ninguém. Eu não poderia ter nascido em uma família melhor. Amo vocês mais que qualquer coisa nesse mundo.

A minha irmã, Nina (ou Nena para os mais próximos), por todas as conversas que fazem eu me sentir mais confiante e muito mais leve para encarar as responsabilidades. Dar risadas ao seu lado sempre vai ser meu passatempo favorito! Estar longe de você é muito difícil, sempre fomos muito grudadas, literalmente dormíamos juntas até pouco tempo atrás, e não vou mentir, sinto falta. Acho que somos muito parecidas, não muito de aparência, mas de jeito, e isso é perfeito pois você me compreende. Até mesmo quando não sabe o que me dizer, está ao meu lado quando eu preciso e isso basta. Eu te amo, Ni.

Aos meus primos, Jonas, Nathália, Camila e Raphael, por todas as conversas e rolês. Quando me mudei para longe tive medo de nos afastarmos, mas isso não aconteceu, muito pelo contrário, sinto que a cada dia nossas relações se fortalecem. Sempre que estou com vocês, sei que tédio é algo que não vou sentir! Seja cantando em karaokês, jogando baralho, rindo por histórias já contadas milhares de vezes mas que nunca perdem a graça ou simplesmente conversando sobre a vida, sempre estou feliz ao lado de vocês. Eu amo cada um de vocês.

Ao CNPq pela confiança e auxílio concebido para a elaboração da pesquisa.

A Universidade “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, pela formação e oportunidade de conhecer pessoas incríveis que quero levar comigo para a vida

Ao Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes - LAGENPE, por todo o apoio, aprendizado, café e companheirismo que tive nesses últimos dois anos. A todos os membros do LAGENPE, muito obrigada por me receberem e se tornarem minha família em Bauru.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal, pela parceria que permitiu esse trabalho ser realizado.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti, pela orientação e oportunidade de trabalhar ao lado de pessoas tão dispostas a ajudar e que te enxergam como muito mais que um companheiro de trabalho. Graças a você tive realizações profissionais e consegui me encontrar na área. Nunca vou conseguir retribuir tudo que você me proporcionou e mantém proporcionando. Me sinto uma das pessoas mais sortudas do mundo em poder trabalhar com alguém que tem tanto conhecimento quanto você e que está disposto a repassar tudo que sabe com muita tranquilidade e disposição. Não posso me esquecer de citar todas as risadas e conversas que fazem os dias ficarem mais alegres e tranquilos, eles são essenciais e é o que faz o LAGENPE ser a grande família que é. Muito obrigada, sei que ainda vou te agradecer em muitos outros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Utsunomia, Tarja para os mais chegados, por todas as lições e ensinamentos. Você é um exemplo e inspira a todos com seu trabalho duro e impecável. Sem você esse trabalho não seria o mesmo. Quantas foram as vezes que fui te perturbar para entender melhor os assuntos compreendidos neste trabalho? Não sei exatamente, mas foram muitos e você sempre com muita calma e didática esteve disposto a me auxiliar. Sou muito grata! Além disso, não posso esquecer de te dizer, obrigada pela rosa!

A Camila e Verônica, minhas salvadoras em muitos momentos de surto! Eu amo muito vocês meninas e não poderia deixar de agradecer vocês por cada conversa, cada risada e, principalmente,

cada fofoca kkkkkkkkk. Fico extremamente feliz de ter encontrado vocês nessa vida, nunca imaginei que vocês se tornariam pessoas tão especiais e essenciais para mim. Eu amo vocês.

A minha melhor amiga, Beatriz, minha Bibi. Não sei como começar a agradecer você, minha companheira para todas as horas, literalmente. Bia, você é a melhor pessoa que eu já conheci, nunca tive uma amizade tão verdadeira e sincera como eu tenho com você. Desde o início da graduação nós estamos juntas, mesmo que nos dois primeiros anos fosse uma web amizade, isso não foi um obstáculo para criarmos vínculos que eu espero que sejam eternos. Nossa amizade significa muito para mim, não consigo imaginar como seria passar por tudo que passei nesses últimos 4 anos sem você ao meu lado. Você é meu porto seguro, a pessoa que posso contar para absolutamente qualquer coisa, desde ir ao atacadão até quando se trata de assuntos mais delicados. Você me ajuda tanto, em tantas situações que escrevendo esse texto fiquei até perdida no que citar. Mas acho que é importante eu relembrar e expor que você é a pessoa que já me viu nos meus melhores e piores momentos, é incrível ver que você move pedras para me ajudar no que for. Com você eu me sinto em casa, independente de onde eu esteja. Eu te amo!

Ao meu namorado, o amor da minha vida, Davi. Meu amor, você entrou de repente em minha vida e se transformou em alguém tão especial que em poucos meses eu já não conseguia ver um futuro que não fosse com você ao meu lado. Nossa relação me faz muito bem, nossos momentos juntos são minhas partes preferidas do dia! Obrigada por ser tão companheiro e carinhoso, estando comigo em todos os momentos, bons e ruins. Te quero para sempre! Te amo s2

RESUMO

A *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) publicou no ano de 2013 projeções sobre o consumo de pescado mundial até o ano de 2030. Nelas, para atender a demanda de 8,3 milhões de habitantes, a produção aumentaria em 23 milhões de toneladas em relação ao ano de 2013, que teve um acúmulo de 97,2 milhões de toneladas. Dados recentes do *State of World Fisheries and Aquaculture* (SOFIA) 2022, relatório estatístico da FAO, oferecem números que superam o esperado em 2013, isto é, o consumo projetado para o ano de 2030 já foi superado em 120.8 milhões. Dentre os produtos do setor de pescados, os peixes são destaque em questões de consumo e, conseqüentemente, geram uma economia sobre a sua produção e comercialização. Devido à alta demanda sob esses produtos pesqueiros é necessário que haja a produção em larga escala, a qual é viabilizada pela piscicultura, atividade aquícola que produz peixes em ambientes controlados. Nesse contexto, os híbridos ganham destaque por apresentarem características que favoráveis ao mercado pesqueiro e que otimizam a sua produção e comercialização como, por exemplo, melhoria na qualidade da carne e resistência a doenças. Do ponto de vista econômico, as espécies híbridas apresentam grande relevância e por isso são produzidos em ampla escala, entretanto, é preciso atenção com os potenciais riscos ambientais de sua produção quando o manejo não é realizado da maneira adequada. A identificação do cariótipo produto da fusão de dois patrimônios genéticos distintos é uma etapa complexa, porém essencial para o manejo correto da espécie híbrida, para isso são aplicadas técnicas citogenéticas de coloração que possibilitam a visualização e identificação cromossômicas dos parentais. O estudo presente nesse trabalho envolve duas espécies de gêneros diferentes que apresentam como diferença principal os cromossomos sexuais heteromórficos, presentes na espécie *Megaleporinus macrocephalus* (fêmea), conhecido popularmente como Piaçu, e ausentes no *Leporinus friderici* (macho), popularmente conhecido como Piau-três-pintas. No estudo, o foco foi na hereditariedade dos cromossomos sexuais, buscando observar a maneira com que a herdabilidade dos cromossomos Z e W, característicos da fêmea *M. macrocephalus*, aconteceria e se seguiria o esperado, aproximadamente metade da prole receberia o cromossomo Z, enquanto a outra metade o cromossomo W. Com os resultados obtidos, sendo eles: parte da prole não sobrevivendo e a ausência do cromossomo W nos sobreviventes, buscou-se entender a razão pelo qual o resultado não seguiu o esperado e encontrar uma relação de causa e consequência entre as mortes e o cromossomo W.

Palavras-chave: hibridação, citogenética, peixes, cromossomos sexuais.

ABSTRACT

The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) published in 2013 projections about global fish consumption until the year 2030. In these projections, to meet the demand of 8.3 billion inhabitants, the production demand would increase by 23 million tons compared to 2013, which had an accumulation of 97.2 million tons. Recent data from the State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2022, an FAO statistical report, provide numbers that exceed the expectations from 2013, meaning that the projected consumption for the year 2030 has already been surpassed by 120.8 million. Among the products in the fish sector, fish are prominent in terms of consumption and, consequently, generate an economy around their production and marketing. Due to the high demand for these fishery products, large-scale production is necessary, which is made possible by aquaculture, an aquaculture activity that produces fish in controlled environments. In this context, hybrids stand out for their characteristics that are favorable to the fishery market and optimize their production and marketing, such as improved meat quality and disease resistance. From an economic perspective, hybrid species are of great importance and are therefore produced on a large scale. However, attention must be paid to the potential environmental risks of their production when management is not carried out correctly. The identification of the karyotype resulting from the fusion of two distinct genetic heritages is a complex but essential step for the correct management of the hybrid species. Cytogenetic and staining techniques are applied to visualize and identify the chromosomal parts of the parents. The study in this work involves two species from different genera, with the main difference being the presence of heteromorphic sex chromosomes in the *Megaleporinus macrocephalus* species (female), popularly known as Piaçu, and their absence in the *Leporinus friderici* species (male), popularly known as Piau-três-pintas. In the following study, the focus was on the heredity of the sex chromosomes, seeking to observe how the heritability of the Z and W chromosomes, characteristic of the female *M. macrocephalus*, would occur and whether it would follow the expected pattern, with approximately half of the offspring receiving the Z chromosome, while the other half would receive the W chromosome. With the results obtained, which included part of the offspring not surviving and the absence of the W chromosome in the survivors, efforts were made to understand why the outcome did not follow the expected pattern and find a cause-and-effect relationship between the deaths and the W chromosome.

Keywords: hybridization, cytogenetics, fish, sex chromosomes.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Hibridação interespecífica em peixes	12
1.2. Considerações sobre as espécies parentais e seus híbridos.....	18
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Origem dos parentais e híbrido.....	20
3.2. Métodos	21
3.2.1 Estimulação de mitoses.....	22
3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos <i>in vivo</i>	22
3.2.3 Caracterização da heterocromatina constitutiva (banda C)	24
3.2.4 Estudo e análise da composição do cariótipo	24
4. RESULTADO	24
5 DISCUSSÃO	26
5.1. Cariótipo do híbrido	26
5.2 Cromossomo sexual heteromórficos.....	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
7. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

O relatório estatístico publicado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *State of the World Fisheries and Aquaculture* (SOFIA), publicado em 2022, aponta que o ano de 2020 atingiu recorde histórico de 214 milhões de toneladas de produtos provenientes da pesca e produção aquícola. Da quantidade acumulada, 178 milhões de toneladas são de animais aquáticos e 36 milhões de toneladas são de algas (FAO, 2022).

Em 2020, mais de 157 milhões de toneladas, ou seja, 89% da produção de animais aquáticos, foram destinados ao consumo humano direto, volume ligeiramente superior ao de 2018, apesar das repercussões da pandemia de COVID-19. Os alimentos aquáticos contribuíram com cerca de 17% da proteína de origem animal consumida em 2019, chegando a 23% em países de renda média baixa e mais de 50% em partes da Ásia e África (FAO, 2022). Novos dados relacionados ao consumo apontam que a pesca e produção aquícola superam a previsão da própria FAO, a qual esperava que em 2030 a produção mundial seria de aproximadamente 120 milhões de toneladas, número já superado no ano de 2022 (FAO, 2022).

A alta demanda sob a proteína faz com que a aquicultura seja superior à pesca de captura, tratando-se de volume acumulado do produto (FAO, 2022). Enquanto a quantidade produzida pela aquicultura cresce, a pesca de captura está em decréscimo (FAO, 2022). Esse crescimento por parte da aquicultura está relacionado com o melhoramento genético e técnicas de hibridização que aperfeiçoam a qualidade do pescado. O fenômeno da hibridação, comumente aplicado na piscicultura, é definido como a fusão de dois patrimônios genéticos diferentes, cujos produtos podem apresentar caracteres taxonômicos intermediários (Mayr, 1963). A produção de híbridos envolve várias espécies Neotropicais, com produtos viáveis e de grande interesse para os produtores (Porto-Foresti *et al.*, 2010).

1.1. Hibridação interespecífica em peixes

O cruzamento espontâneo entre diferentes espécies sempre foi considerado, pela maioria dos zoólogos, como um evento esporádico em animais, que se mantém em frequências baixas (Mayr 1963). Isso se deve a existência de barreiras pré e pós zigóticas bem definidas, que são responsáveis pelo isolamento reprodutivo espacial, temporal e comportamental entre diferentes espécies, além de exemplos em que as primeiras gerações filiais híbridas são estéreis e apresentam menor viabilidade em um ambiente onde as espécies parentais estão mais bem adaptadas (Mayr, 1963).

Atualmente, também é reconhecido que a hibridação em pequena escala pode contribuir em processos adaptativos e de especiação (Mallet, 2007; Willis *et al.*, 2012; Abbott *et al.*, 2013; Hasselman *et al.*, 2014). Estima-se que, no geral, 6 a 10% das espécies animais realizam cruzamentos interespecíficos (Mallet, 2005). Em alguns casos, a introgressão genética (ou hibridação introgressiva), ou seja, a transferência do DNA de uma espécie para o conjunto genômico de outra espécie pelo retrocruzamento repetido dos indivíduos híbridos com uma ou ambas as espécies parentais, pode ser uma importante fonte de variabilidade genética nas populações (Arnold & Martin, 2009).

A contribuição da hibridação em processos adaptativos ou de especiação vai depender dos níveis de fertilidade dos híbridos F1, da possibilidade de vantagem adaptativa e do estabelecimento nas linhagens híbridas avançadas (retrocruzamentos ou gerações F2, F3 etc.) (Barton, 2001). Caso haja fertilidade, a introgressão de poucos loci pode promover a divergência adaptativa e assim facilitar a especiação (Abbott *et al.*, 2013), como o sugerido para a alta diversidade de ciclídeos (Smith *et al.*, 2003). Neste caso, a hibridação introgressiva pode não constituir ameaças ecológicas às espécies envolvidas, justamente por estar intimamente relacionada aos processos evolutivos das espécies durante a sua história biológica, resultando na formação de zonas híbridas que podem manter-se estáveis por milhares de anos em uma determinada região geográfica (Mallet, 2005;

Willis *et al.*, 2012).

Recentemente, tem sido observado o aumento expressivo da ocorrência de híbridos entre diversas espécies de peixes, o qual resulta diretamente ou indiretamente de ações humanas (PortoForesti *et al.*, 2010; 2013; Prado *et al.*, 2012; 2017; Nobile *et al.*, 2019). Os resultados são difíceis de prever, e podem variar desde o surgimento de zonas híbridas em regiões geográficas limitadas, até modificações genéticas irreversíveis, como a extinção genética de uma ou ambas as espécies parentais (Allendorf *et al.*, 2001; 2010).

Em ambientes onde apenas os híbridos F1 são encontrados, ou seja, são estéreis, as consequências da hibridação podem envolver competição por recursos e a perda de esforços reprodutivos das espécies parentais, não havendo modificação genética e expansão populacional (Toledo-Filho *et al.*, 1994; 1998). Por outro lado, quando os híbridos são férteis e ocorre introgressão genética, pode ocorrer o aumento da variabilidade genética e possibilidade de especiação, representando uma evolução contemporânea (Allendorf *et al.*, 2008). Porém, estes retrocruzamentos, principalmente quando ocasionados por ações humanas, de maneira rápida e com frequência elevada, também levam à perda de alelos das espécies parentais e ao rearranjo de combinações gênicas previamente existentes que podem nunca mais ser recriadas, resultando no desaparecimento de adaptações a determinados ambientes (Laikre *et al.*, 1999). Caso as barreiras adaptativas das zonas híbridas sejam quebradas, podem ser formadas populações compostas inteiramente por indivíduos recombinantes (Huxel, 1999; Epifanio & Philipp, 2001; Allendorf *et al.*, 2001; Muhlfeld *et al.*, 2009).

Uma questão importante a ser abordada é se as populações híbridas estarão adaptadas ao ambiente, preenchendo os nichos ecológicos anteriormente ocupados pelas espécies parentais, ou se todo o *pool* gênico será perdido (Allendorf *et al.*, 2001). No grupo dos peixes, as principais alterações ambientais que têm levado ao aumento da frequência de híbridos em populações naturais

são a modificação de locais de desova e introdução de espécies exóticas e híbridos interespecíficos de peixes da aquicultura (Bartley *et al.*, 2001; Scribner *et al.*, 2001; Porto-Foresti *et al.*, 2010; 2013; Prado *et al.*, 2012; 2017).

Até o ano de 2014, aproximadamente 17 produtos híbridos foram reportados como usualmente cultivadas pela aquicultura nacional, sendo produzidas a partir de 12 espécies pertencentes as ordens de Characiformes e Siluriformes (Nobile *et al.*, 2019). Dentre os híbridos com significativa produção pela piscicultura nacional, destacam-se representantes do gênero *Pseudoplatystoma*, como: “pintachara” (obtido pelo cruzamento entre uma fêmea *Pseudoplatystoma corruscans* com um macho *Pseudoplatystoma reticulatum*), “cachapira” (progênie do cruzamento entre uma fêmea *Pseudoplatystoma reticulatum* e um macho *Pseudoplatystoma corruscans*) e “surubim” (nomenclatura popular para diversas linhagens híbridas de bagres). O cultivo destes híbridos, quando somados aos seus parentais, representaram 3,80% da produção aquícola nacional no período entre os anos 2013-2016 (Nobile *et al.*, 2019).

As capturas de peixes selvagens de muitas espécies estão se tornando insuficientes, e a disponibilidade de pescado dependerá certamente do desenvolvimento de uma correta exploração dos recursos da aquicultura, que representa uma solução para a grande demanda da indústria alimentícia (Danancher & Garcia-Vazquez, 2011) e pode ser um importante fator de preservação das populações selvagens (Nobile *et al.*, 2019). Entretanto, introduções e escapes (intencionais ou não) são responsáveis pela dispersão de uma alta quantidade de peixes híbridos do cultivo para a natureza, onde potencialmente atuarão como agentes modificadores negativos (Hashimoto *et al.*, 2013; Casimiro *et al.*, 2018, Nobile *et al.* 2019).

Além dos riscos gerados à manutenção da biodiversidade e a disponibilidade dos recursos pesqueiros nacionais, a problemática da hibridação interespecífica na natureza também se mostra como uma ameaça para o desenvolvimento da aquicultura nacional e a sua capacidade de atender

uma demanda crescente, uma vez que, os indivíduos selvagens das populações naturais constituem o reservatório genético dos painéis de seleção de reprodutores da produção em cativeiro (Hashimoto *et al.*, 2013; Casimiro *et al.*, 2018; Nobile *et al.*, 2019).

O crescimento do consumo leva a busca de métodos que otimizem a produção de peixes, sendo a hibridação artificial uma estratégia frequentemente aplicada pois trata-se de um processo de melhoramento genético em que acontece o cruzamento entre diferentes espécies, podendo estas pertencerem ao mesmo gênero ou não, com intuito de gerar uma espécie híbrida que apresenta qualidades que agreguem valor econômico ao produto (Hubbs, 1955; Rhymer e Simberloff, 1997). Os resultados da hibridação têm propiciado um desenvolvimento essencial para a piscicultura brasileira e fornecem produtos manipulados geneticamente de relevante valor comercial, com boa aceitação no mercado consumidor (Hashimoto, 2011).

Entre os principais objetivos da hibridização artificial, está a busca de uma produção de animais com melhor desempenho genético, como crescimento mais rápido, resistência a doenças, tolerância às variações da temperatura e salinidade da água, e uma melhor qualidade da carne (Porto-Foresti *et al.*, 2011). Além disso, o procedimento visa, principalmente, realizar a produção de híbridos que apresentem vigor híbrido, também chamado de heterose, no qual os indivíduos possuem melhor desempenho em relação às linhagens cruzadas e que, conseqüentemente, são mais proveitosos para o cultivo (Toledo-Filho *et al.*, 1998).

Outras características que se procuram atingir a partir da hibridação são as linhagens estéreis, monossexuais, produção de linhagens novas, poliplóides, genótipos com baixa herdabilidade e linhagens andro e ginogenéticas, ou seja, prole apenas com material genético do macho ou da fêmea, respectivamente (Toledo-Filho *et al.*, 1998). A hibridação 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).

As características esperadas com o cruzamento de espécies são vantajosas do ponto de vista comercial, porém sua produção pode levar a riscos como a contaminação genética dos estoques de cultivo, a comercialização de produtos híbridos como espécies puras, a introdução de espécies exóticas e escapes de produtos de piscicultura para o ambiente natural e até eventos de introgressão genética e extinção das espécies nativas (Prado, 2010). A identificação e diferenciação de espécies parentais puras e seus híbridos é uma etapa essencial que ajuda a evitar os riscos que a hibridação pode causar e possibilita a realização de um manejo adequado destes animais, evitando a contaminação de estoques de cultivo, escapes de pisciculturas e problemas genéticos e ecológicos para o meio ambiente (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

Mesmo com a produção dos híbridos sendo superior em questão de volume nos ambientes controlados, devido à importância comercial, as espécies híbridas também podem ser geradas a partir de eventos naturais (Hubbs, 1955 e 1961). A possibilidade desse evento é viabilizada pela ampla gama de características genéticas e reprodutivas que estes animais apresentam, como a fertilização externa e competição por locais de desova, que porventura acabam facilitando o surgimento de linhagens híbridas (Hubbs, 1955).

A hibridação pode ser realizada entre espécies distintas de mesmo gênero ou de gêneros distintos, sendo essa denominada hibridação intergenérica (Fernandes, 2010). Casos como esse podem ser vistos no híbrido em estudo produzido a partir do cruzamento entre *Megaleporinus macrocephalus* (fêmea) e *Leporinus friderici* (macho), popularmente conhecidos como Piaçu e PiauTrês-Pintas, respectivamente, que são peixes pertencentes a gêneros distintos e de mesma família, a Anostomidae.

O cruzamento entre espécies de mesma família e gêneros distintos não é novidade no Brasil. No ano de 1985, o Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais (CEPTA - Pirassununga, SP) realizou a partir da metodologia de hibridação artificial o cruzamento entre a

fêmea de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e macho de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), obtendo como produto o “Tambacu” (Bernardino *et al.*, 1986). A partir disso, surgiu um aumento significativo no interesse pela adoção dessa metodologia, e desde então, várias espécies têm sido empregadas com êxito em programas com essa finalidade (Godinho, 2007; Porto-Foresti *et al.*, 2008).

1.2. Considerações sobre as espécies parentais e seus híbridos

A família Anostomidae pertence à ordem Characiformes e é considerada uma das famílias mais ricas em número de espécies de peixes Neotropicais, com 145 espécies válidas, distribuídas em 13 gêneros (Eschmeyer & Fong, 2015; Ramirez *et al.*, 2017; Sidlauskas, 2022). As espécies parentais do híbrido em estudo pertenciam a um mesmo gênero, o *Leporinus*, contudo, após a reclassificação taxonômica houve a separação dos gêneros em *Megaleporinus* e *Leporinus* (Ramirez *et al.*, 2017).

As espécies parentais do estudo são de gêneros filogenéticos próximos (Ramirez *et al.*, 2017), por essa razão compartilham características citogenéticas comuns. As duas espécies possuem número diplóide igual a 54 cromossomos ($2n=54$) compostos por cromossomos meta- e submetacêntricos (Galetti Jr *et al.*, 1991). Em relação à região organizadora de nucléolos (RON) ela é classificada como simples, estando presente em apenas um par. Entretanto, mesmo em poucos pares, é um bom marcador espécie-específico pois varia sua localização de espécie em espécie, isto é, em cada espécie do grupo a RON está presente em um par cromossômico diferente (Galetti *et al.*, 1984).

Características como os padrões de heterocromatina e cromossomos sexuais do sistema ZZ/ZW, diferenciam os dois gêneros. Os *Megaleporinus* apresentam cromossomos sexuais heteromórficos, enquanto nos *Leporinus* há ausência destes cromossomos (Artoni *et al.*, 1999; Venere *et al.*, 2004). Essa diferença em relação aos cromossomos sexuais foi o principal fator que

levou Ramirez e colaboradores em 2017 a reclassificar algumas espécies de *Leporinus* como *Megaleporinus*.

Nas fêmeas de *Megaleporinus*, gênero com que apresenta os cromossomos Z e W, é possível observar que o tamanho do cromossomo W se sobressai quando comparado com o cromossomo Z. Além disso, temos o W sendo um cromossomo submetacêntrico com grande quantidade de heterocromatina, enquanto o Z apresenta morfologia similar aos outros cromossomos autossômicos e apenas heterocromatina a terça parte distal do braço longo heterocromática (Nakayama *et al.*, 1994; Galetti *et al.*, 1995; Parise-Maltempi *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2009). Na maioria dos casos, a diferença entre os cromossomos homólogos e os sexuais envolve blocos heterocromáticos (Silva, 2013).

Para o estudo citogenético do gênero *Megaleporinus*, o cromossomo W é uma fonte de informação muito grande, tendo em vista que sua composição é rica em DNAs satélites (DNAsat), sendo que 14 desses DNAsat são exclusivos deste cromossomo sexual (Utsunomia, *et al.*, 2019).

Os peixes pertencentes ao gênero dos *Leporinus*, não tem como fonte principal de estudo o cromossomo W, devido à ausência dos cromossomos sexuais heteromórficos nas espécies do gênero (Artoni *et al.*, 1999; Venere *et al.*, 2004). Os estudos com os *Leporinus* utilizam a NOR como um dos métodos de pesquisa, pois nas diferentes espécies do gênero pode-se observar a NOR localizada em diferentes cromossomos. Isso contribui com a marcação citotaxonômica dos indivíduos (Galetti *et al.*, 1984; 1991).

Associado com as técnicas de reprodução de híbridos na piscicultura, as técnicas citogenéticas são utilizadas nas fases iniciais do processo para a identificação genética de organismos interespecíficos ou intergenéricos. Busca-se com esses procedimentos verificar os níveis de ploidia e a morfologia dos cromossomos, assim como a procedência dos complementos cromossômicos dos parentais nos produtos resultantes da hibridação (Toledo-Filho *et al.*, 1994). Nos casos em que

híbridos e parentais apresentam o mesmo cariótipo, torna-se necessário o emprego de técnicas de colorações e bandamentos cromossômicos na tentativa de encontrar um marcador que os diferencie (Hashimoto, 2011). No contexto de divergências na composição genômica, o presente estudo terá como objetivo compreender o resultado do cruzamento de espécies pertencentes a gêneros distintos e identificar na espécie híbrida como houve a distribuição dos cromossomos parentais para a prole, com foco da hereditariedade dos cromossomos sexuais do sistema ZZ/ZW, presente apenas em uma das espécies, utilizando uma abordagem citogenética.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a crescente produção de espécies híbridas, principalmente, destinadas ao comércio e os perigos envolvidos na produção artificial como a contaminação genética e a competição com espécies nativas, em casos de escape para o ambiente natural. Se torna fundamental a aplicação de técnicas citogenéticas capazes de identificar os híbridos e interpretar seu genoma de forma com que haja a compreensão da composição genética desses animais.

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização citogenética do híbrido intergenérico entre as espécies parentais *M. macrocephalus* (fêmea) e *L. friderici* (macho).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem dos parentais e híbrido

As espécies puras que foram examinadas no estudo tiveram sua coleta realizada nos tanques de piscicultura do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) localizado em Jaboticabal. A criação

dos híbridos ocorreu através de um cruzamento artificial também conduzido na instituição. Para estimular a desova, foi utilizada a hipófise de carpa que foi previamente tratada com solução salina (NaCl 0,9%), na proporção de 1 mg de glândula por 0,1 mL de solução, e injetada na nadadeira ventral dos indivíduos. Esse processo foi realizado em duas doses para fêmeas e machos, de acordo com as diretrizes estabelecidas por Reynalte-Tataje e Zaniboni-Filho (2010). Após o período de reprodução, quando alcançaram o tamanho apropriado, cerca de 50g, selecionamos 20 animais da prole para o isolamento de cromossomos metafásicos.

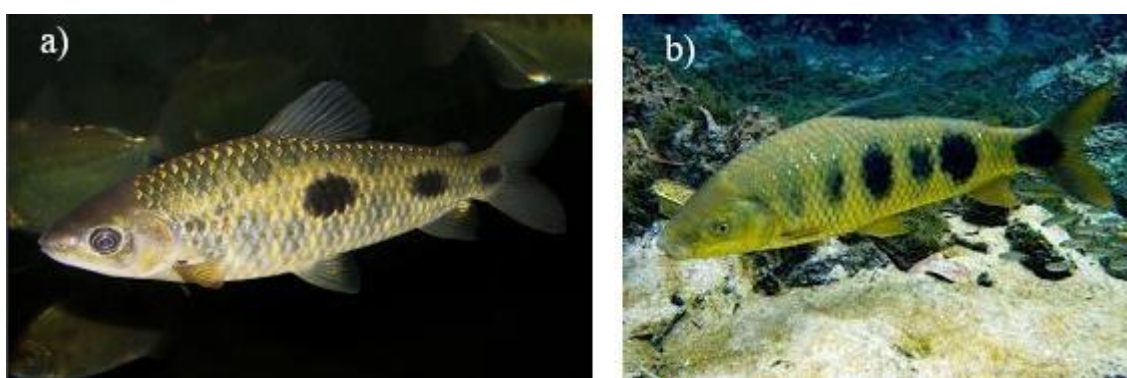


Figura 1. Exemplares dos peixes parentais utilizados no cruzamento. (a) *Leporinus friderici* macho (b) *Megaleporinus macrocephalus* fêmeas Fonte: (a) Enercan (b) João Lucas Feitosa.



Figura 2. Exemplar da espécie híbrida

3.2. Métodos

Para realizar as análises citogenéticas foram utilizados método de estimulação de mitoses (Oliveira *et al.*, 1988) e preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981) em todos os exemplares, parentais e híbridos, a morte foi induzida no Laboratório de Genômica e Conservação

de Peixes (LAGENPE) pertencente a Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), campus Bauru.

Posteriormente, visando comparar o cariótipo dos indivíduos, foi realizado o bandamento C de Sumner (1972) em todos na fêmea *M. macrocephalus* e no produto resultado do cruzamento artificial para a observação dos padrões de heterocromatina entre eles.

3.2.1 Estimulação de mitoses

O procedimento utilizado para a estimulação das mitoses nos exemplares foia de aplicação de fermento biológico na musculatura dorsolateral dos peixes, desenvolvida por Oliveira *et al.*, (1988). A técnica consiste em:

1. preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7ml de água destilada;
2. incubar a solução em uma estufa (37° C) por cerca de 20 min;
3. injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1ml para cada 100 g de peso do animal. A dose administrada pode ser realizada em duas doses, dividida e aplicada em um período de 48h;
4. manter o animal em aquário bem aerado, com temperatura de 28°C.

3.2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos *in vivo*

Para a obtenção dos cromossomos metafásicos *in vivo* foi utilizado o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1993), com algumas alterações. Nessa técnica utiliza-se a colchicina, solução hipotônica e fixador composto por metanol e ácido acético. O procedimento consiste em:

1. injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1ml para cada 100g de peso do animal;
2. deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período aproximado de 50 min;
3. induzir a morte do animal, e retirar o rim anterior, posterior e, se necessário, parte das brânquias. Transferir o material para uma placa de petri, contendo 7ml 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 logo após ressuspender o material 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 boa lavagem e completa fixação das células em suspensão;
10. pingar o material em lâminas previamente tratadas em solução de HCL 10%;
11. deixar secar ao ar.

3.2.3 Caracterização da heterocromatina constitutiva (banda C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva (banda C), foi utilizada a técnica descrita inicialmente por Sumner (1972) com algumas modificações, a qual caracteriza-se pela ação sequencial de ácido, base e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente as regiões de heterocromatina, mais compactadas.

A técnica 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, retirando todo o excesso restante de HCl;
2. passar por uma solução de BaOH₂ a 5% por cerca de 5-15 segundos e posteriormente lavar com água destilada;
3. banhar em HCl 1N a 60oC, e logo em seguida lavar novamente com água destilada;
4. incubar por 30 minutos em 2xSSC (pH=6,8) a 60oC e lavar com água destilada;
5. corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa 5% em tampão fosfato (pH=6,7).

3.2.4 Estudo e análise da composição do cariótipo

Utilizando o fotomicroscópio OLYMPUS, modelo BX50, em objetiva de imersão de 100X, foram analisadas e fotografadas metáfases em boa qualidade de visualização, ou seja, com ótima dispersão e morfologia de cromossomos. Após a captura das imagens, o aplicativo Adobe Photoshop CC 2014 foi utilizado para a melhor observação dos cromossomos e montagem de cariótipo.

4. RESULTADO

Os estudos que envolvem híbridos não dependem apenas das características obtidas e da identificação citogenética do indivíduo. Para o início de pesquisas de espécies híbridas é necessário ter conhecimento das espécies parentais, nesse caso, a fêmea *Megaleporinus macrocephalus* e o macho *Leporinus friderici* (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies parentais e seus respectivos híbridos

GERAÇÃO PARENTAL			GERAÇÃO HÍBRIDA
Parental fêmea		Parental macho	Número da prole
<i>Megaleporinus macrocephalus</i>	X	<i>Leporinus friderici</i>	13 indivíduos

Ambas as espécies envolvidas no cruzamento apresentam número diploide igual a 54, portanto, cada gameta (ovócitos e espermatozoides) apresenta número haploide igual a 27. Todos os exemplares obtidos (13), apresentaram a composição $2n=54$, assim como a dos parentais. Além disso, a fórmula cariotípica dos parentais é formada por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Galetti *et al.*, 1981; 1984) e o número fundamental é igual a 108, assim como identificado na espécie híbrida.

Outro fator observado foi a ausência dos cromossomos sexuais heteromórficos presentes na fêmea, mais especificamente o cromossomo W que apresenta morfologia diferente dos cromossomos autossomos e que facilmente pode ser observado (Figura 2). Dos 13 exemplares analisados, a presença do cromossomo sexual W não foi identificada em nenhum deles.

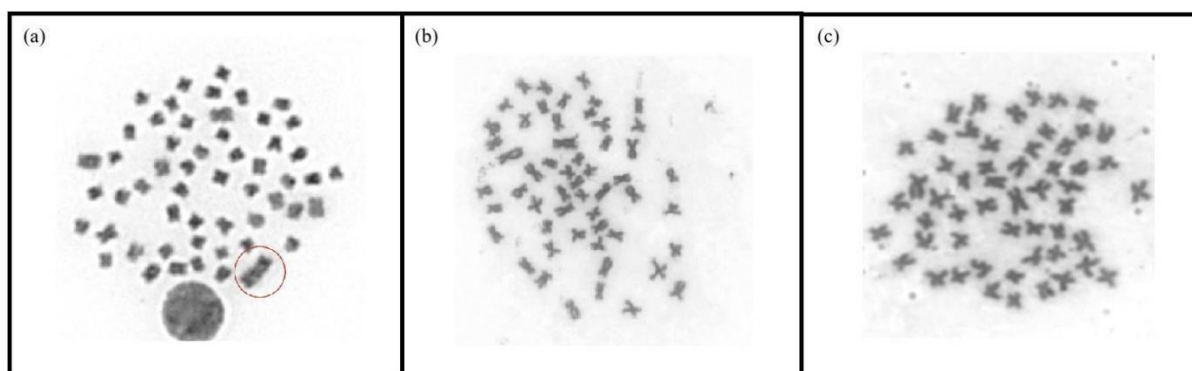


Figura 3. Preparações metafásicas contendo a comparação entre as espécies cruzadas (parentais) e o produto híbrido. Circulado em vermelho está o cromossomo sexual W. (a) Fêmea *M. macrocephalus* ($2n=54$) (b) Macho *L. friderici* ($2n=54$) (c) Espécie híbrida ($2n=54$).

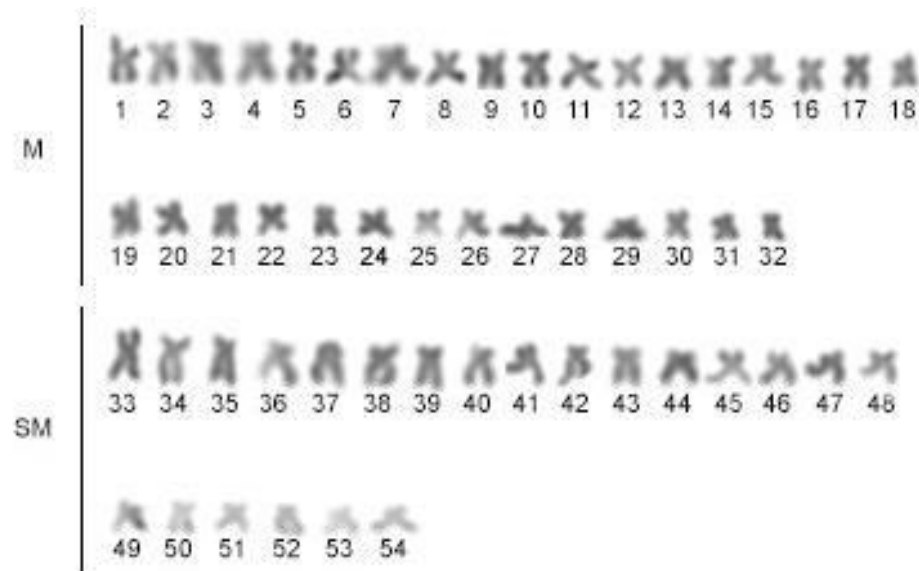


Figura 4. Cariótipo do híbrido ($2n=54$)

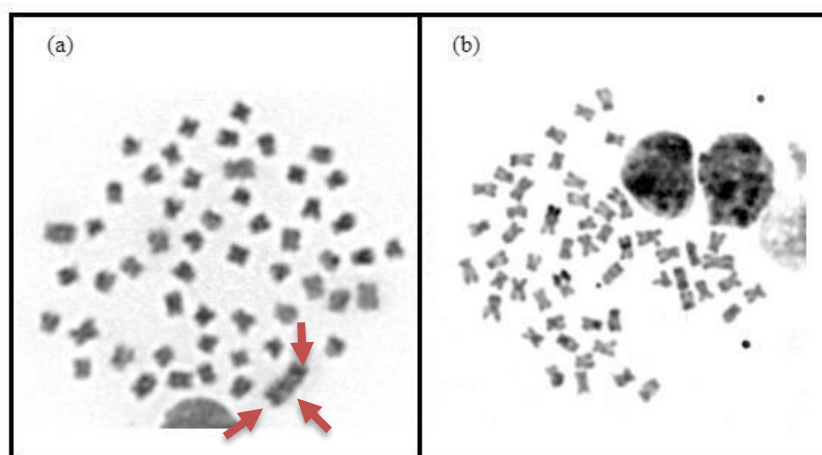


Figura 5. Comparação entre os resultados da Banda C (Summer, 1972) de *M. macrocephalus* (a) e do híbrido (b).
Observa-se diferentes padrões de heterocromatina. Apontados com seta vermelha estão os acúmulos de heterocromatina do cromossomo W, não identificado na espécie híbrida.

5 DISCUSSÃO

5.1. Cariótipo do híbrido

A composição cariótica seguiu os padrões esperados em um cruzamento. O híbrido apresentou o mesmo número diploide dos pais e sua fórmula cromossômica (108) também se manteve como as observadas nos parentais, ou seja, com cromossomo metacêntricos e submetacêntricos. Existem casos de cruzamento interespecíficos, como o realizado por Kossowski *et*

al. (1983) com *Colossoma macropomum* (Tambaqui) e *Mylossoma duriventris* (Pacupeva), em que o cariótipo do híbrido é distinto dos parentais, apresentando em seu cariótipo cromossomo acrocêntrico herdado da espécie parental macho.

5.2 Cromossomo sexual heteromórficos

O cromossomo W é um cromossomo sexual submetacêntrico heteromórfico que apresenta grande acúmulo de heterocromatina, diferente do cromossomo Z que se assemelha aos cromossomos autossômicos e tem quantidade de heterocromatina menor (Nakayama *et al.* 1994; Galetti *et al.*, 1995; Parise-Maltempi *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2009).

A espécie parental *M. macrocephalus* apresenta o sistema de cromossomos sexuais heteromórficos ZZ/ZW, por ser fêmea apresenta os cromossomos Z e W. Pensando em herdabilidade, ambos os cromossomos apresentam 50% de chances, entretanto, não pudemos observar a presença do cromossomo W em nenhum dos 13 exemplares híbridos, consequentemente, todos herdaram o cromossomo Z.

Utsunomia *et al.* (2019), publicou o artigo “Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome”, no qual mostra por meio da utilização do método “*Fluorescence in situ hybridization*” (FISH) a riqueza de DNAs satélites (DNAsat) no cromossomo W, ou seja, o cromossomo é rico em sequências repetitivas. Além dos resultados deste trabalho, a aplicação do método de Banda C nos mostra que há acúmulo de heterocromatina no cromossomo.

Levando isso em consideração, podemos criar uma relação entre sua composição e a ausência do cromossomo, a qual, talvez, tenha inviabilizado o surgimento de híbridos com o W em seu cariótipo. Não se pode afirmar a hipótese devido ao não conhecimento do sistema sexual presente nos exemplares híbridos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de espécies híbridas é complexo, tendo em vista que a expressão gênica e o controle metabólico acontecem por combinação de dois materiais genéticos distintos, entretanto, o conhecimento e identificação é essencial para o manejo adequado dessas espécies.

Os resultados das análises citogenéticas nas espécies parentais *M. macrocephalus* e *L. friderici* e na espécie híbrida, nos permitem concluir que:

1. As espécies parentais *M. macrocephalus* e *L. friderici*, e o híbrido, apresentam cariótipos similares em número diploide, fórmula cariótipica e, conseqüentemente, número fundamental;
2. A espécie fêmea apresenta o sistema de cromossomo sexuais heteromórficos enquanto o macho apresenta cromossomos homomórficos;
3. Os exemplares da espécie não apresentaram o cromossomo W em seu cariótipo;
4. A aplicação do método de banda C demonstrou a presença de regiões de acúmulo de heterocromatina no cromossomo W.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Richard et al. Hybridization and speciation. **Journal of evolutionary**

biology, v. 26, n. 2, p. 229-246, 2013.

ALLENDORF, Fred W. et al. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends**

in ecology & evolution, v. 16, n. 11, p. 613-622, 2001.

ALLENDORF, Fred W. et al. Genetic effects of harvest on wild animal populations.

Trends in ecology & evolution, v. 23, n. 6, p. 327-337, 2008.

ALLENDORF, Fred W.; HOHENLOHE, Paul A.; LUIKART, Gordon. Genomics and the

future of conservation genetics. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 10, p.

697-709, 2010.

ARNOLD, Michael L.; MARTIN, Noland H. Adaptation by introgression. **Journal of**

biology, v. 8, n. 9, p. 1-3, 2009.

ARTONI, R.F.; MOLINA, W.F.; BETOLLO, L.A.C; GALETTI Jr., P.M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genet. Mol. Biol.** 22: 39-44. 1999

BARTLEY, D.M.; RANAK; I.M.M.I.K. The use of hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 10: 325-337. 2001.

BARTON, Nicholas H. Adaptation at the edge of a species' range. In: **Integrating ecology and evolution in a spatial context**. 2001.

BERNADINO, G; MENDONÇA, JOJ; RIBEIRO, LP; ALCANTRA, RCG; FERRARI, VA e FIJAN, N. Primeira reprodução do tambacu; um híbrido do gênero *Colossoma* In: Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma*. (Projeto 14 Aquicultura/Brasil 3-7-76-0001-CIID), CEPTA, Pirassununga: 11-12. 1986.

CASIMIRO, Armando César Rodrigues et al. Escapes of non-native fish from flooded aquaculture facilities: the case of Paranapanema River, southern Brazil. **Zoologia** (Curitiba), v. 35, 2018.

DANANCHER, Delphine; GARCIA-VAZQUEZ, Eva. Genetic population structure in flatfishes and potential impact of aquaculture and stock enhancement on wild populations in Europe. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, p.

441-462, 2011.

EPIFANIO e PHILIPP. Simulating the extinction of parental lineages from introgressive hybridization: the effects of fitness, initial proportions of parental taxa, and mate choice. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 10:339-354. 2001.

FAO/Sofia 2022: **produção global da aquicultura cresce e capturas caem**. FAO.org, 2022. Disponível em: <https://www.seafoodbrasil.com.br/fao-sofia-2022producao-global-da-aquicultura-cresce-e-capturas-caem>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2023.

FERNANDES, J. B. K. Produção de híbridos na piscicultura. [S. l.], 2010.

FORESTI, F.; ALMEIDA TOLEDO, LF de; TOLEDO F°, S. A. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 31, n. 3, p. 137-144, 1981.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI DE ALMEIDA-TOLEDO, L. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro shortterm treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49, p. 810-813, 1993.

GALETTI, JR, P. M. et al. Heteromorphic sex chromosomes in three species of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 29, n. 3, p. 138-142, 1981.

GALETTI JR, P. M. et al. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. **Caryologia**, v. 37, n. 4, p. 401-406, 1984.

GALETTI JR, P. M.; CESAR, A. C. G.; VENERE, P. C. Heterochromatin and NORs variability in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Caryologia**, v. 44, n. 3-4, p. 287-292, 1991.

GALETTI Jr. PM; LIMA, NRW e VENERE PC .A monophyletic ZW chromosome system in Leporinus (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, 60: 375-382. 1995^a.

Godinho HP. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 31(3): 351-360. 2007

HASHIMOTO, Diogo Teruo. Aplicação de marcadores moleculares no monitoramento genético de programas de hibridação interespecífica em pisciculturas brasileiras. 2011.

HASHIMOTO, Diogo Teruo et al. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: Approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 876-884, 2013.

Hubbs CL (1955) Hybridization between fish species in nature. **Systematic Zoology**,

4: 1-20.

HUBBS, Carl L. Isolating mechanisms in the speciation of fishes. **Vertebrate speciation**, p. 5-23, 1961.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by family/sub-family**. 2015

HASHIMOTO, Diogo Teruo et al. Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Genética**, v. 137, p. 135-140, 2009.

HASSELMAN, E. E. A.; MEGHAN, C. M.; PAUL, B.; THOMAS F. S.; ANNA, A. P.; ERIC, P. P. Human disturbance causes the formation of a hybrid swarm between two naturally sympatric fish species. **Molecular Ecology**, v. 2014, n. 23, p. 1137-1152, 2014.

HUBBS, C.L. Hybridization between Fish Species in Nature. **Systematic Biology**, Volume 4, Issue 1, March 1955, Pages 1–20, <https://doi.org/10.2307/sysbio/4.1.1>

HUXEL, Gary R. Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. **Biological conservation**, v. 89, n. 2, p. 143-152, 1999.

- KOSSOWSKI, Q.; BRACAMONTE, N. O.; VELASCO, J. Q. Cariotipo del híbrido de *Colossoma macropomum* (hembra)(Cuvier) 1818 *Mylossoma duriventris* (macho)(Cuvier) 1818 y sus progenitores. **Acta Científica Venezolana**, v. 34, p. 173-175, 1983.
- LAIKRE, Linda. Conservation genetics of Nordic carnivores: lessons from zoos. **Hereditas**, v. 130, n. 3, p. 203-216, 1999.
- MALLET, James. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 5, p. 229-237, 2005.
- MALLET, James. Hybrid speciation. **Nature**, v. 446, n. 7133, p. 279-283, 2007.
- MAYR, E. The breakdown of isolating mechanisms (hybridization). In: **E. Mayr. Animal species and evolution**, Belknap Press, Cambridge, MA, 110-135. 1963.
- MUHLFELD, Clint C. et al. Hybridization rapidly reduces fitness of a native trout in the wild. **Biology letters**, v. 5, n. 3, p. 328-331, 2009.
- NAKAYAMA, Ichiro et al. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, n. 1, p. 31-39, 1994.

NOBILE, André B. et al. DNA metabarcoding of Neotropical ichthyoplankton: Enabling high accuracy with lower cost. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 3, p. e35060, 2019.

OLIVEIRA, C. et al. Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**, v. 41, n. 3-4, p. 227-236, 1988.

PARISE-MALTEMPI, P. P. et al. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, n. 3, p. 218-223, 2007.

PORTO-FORESTI, Fábio et al. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 195-202, 2008.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T.; PRADO, F.D.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. A Híbridaç o interespecífica em peixes. **Panorama da Aquicultura**. 126:28-33. 2011.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T.; PRADO, F.D.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F.

Hibridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. In: Baldisserotto B e Gomes LC (eds.), Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 589-606. 2010.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T.; PRADO, F.D.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. A Hibridação interespecífica em peixes. **Panorama da Aquicultura**. 126:28-33. 2011.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D.T.; PRADO, F.D.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. (2013). Genetic Markers for the Identification of Hybrids among Catfish Species of the Family Pimelodidae. **Journal of Applied Ichthyology**, 29: 643-647. 2013.

PRADO, F. Caracterização citogenética e molecular das espécies pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos utilizados na piscicultura brasileira. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. p. 122. 2010.

PRADO, Fernanda Dotti do *et al.* Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 57-64, 2012.

- PRADO, Fernanda Dotti et al. Hybridization and genetic introgression patterns between two South American catfish along their sympatric distribution range. **Hydrobiologia**, v. 788, p. 319-343, 2017.
- RAMIREZ, J.L.; BIRINDELLI, J.L.O.; GALETTI Jr, P.M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 107, p. 308-323, 2017.
- REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E. Cultivo de piapara, piaçu, piava e piaugênero Leporinus. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 73-99, 2010.
- SCRIBNER, Kim T. et al. Environmental correlates of toad abundance and population genetic diversity. **Biological conservation**, v. 98, n. 2, p. 201-210, 2001.
- SIDLAUSKAS, Brian L. et al. Total evidence phylogenetic analysis reveals polyphyly of Anostomoides and uncovers an unexpectedly ancient genus of Anostomidae fishes (Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 194, n. 2, p. 626-669, 2022.
- SILVA, Keteryne Rodrigues da. Estudos de elementos repetitivos presentes no genoma da espécie *Schizodon borelli* (Characiformes: Anostomidae). 2013.

SMITH, Peter F.; KONINGS, A. D.; KORNFIELD, I. R. V. Hybrid origin of a cichlid population in Lake Malawi: implications for genetic variation and species diversity. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 9, p. 2497-2504, 2003.

SUMNER, A. T. The nature and mechanisms of chromosome banding. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 6, n. 1, p. 59-87, 1982.

TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.; FORESTI, F.; BERNALDINO, G.; CALCAGNOTTO, D. Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre Pacu e Tambaqui. **Caderno Ictiogenética 2**. p. 4. 1994.

TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; CALCAGNOTTO, D.; SANTOS, S.B.A.F.; BERNARDINO, G. Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. **Cadernos de Ictiogenética 4**, CCS/USP, São Paulo. 1998.

Uma produção pesqueira e aquícola sem precedentes contribui decisivamente para a segurança alimentar global. FAO.org, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/es/c/1585153/>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2023.

UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.d.A., Ruiz-Ruano, F.J. Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex

chromosome. **Sci Rep** 9, 5856 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-01942383-8>

VENERE, P.C. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae, Characiformes). **Genetica**. Dordrecht: Kluwer Academic Publ, v. 121, n. 1, p. 75-80, 2004.

WILLIS, S.C., MACRANDER, J., FARIAS, I.P. *et al.* Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *cichla*) using multi-locus data. **BMC Evol Biol** 12, 96 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-96>