

**GENÉTICA APLICADA À PISCICULTURA: IDENTIFICAÇÃO DO HÍBRIDO “TAMBATINGA”, DAS ESPÉCIES TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E PIRAPITINGA (*Piaractus Brachypomus*). Aline Rodrigues, Fábio Porto-Foresti, Jehud Bortolozzi, José Senhorini, Fausto Foresti. Inter-áreas-Ciências da Vida – Laboratório de Genética de Peixes – Faculdade de Ciências – Campus de Bauru.**

A partir dos anos 80, abordagens genéticas passaram a contribuir de maneira efetiva nos programas de criação de peixes. 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.

As técnicas de manipulação cromossômica precisam ser bem conhecidas e compreendidas, com suas respectivas consequências, por todos os que trabalham em piscicultura. Isto porque tais técnicas vêm sendo gradativamente incorporadas às rotinas dos programas desenvolvidos em nível mundial e, há alguns anos, começaram a ser experimentadas em nosso país.

Dentre as metodologias clássicas de manipulação genética que mais têm sido aplicadas nas pisciculturas brasileiras, está a hibridação interespecífica visando ao aumento da produtividade e a obtenção de linhagens estéreis. A hibridação interespecífica já faz parte da rotina de muitas estações de piscicultura. As vantagens apresentadas por essa tecnologia são a facilidade no manejo e na execução prática, permitindo até mesmo que seja aplicada em cultivos do tipo extensivo.

Um outro aspecto relevante diz respeito aos riscos biológicos potenciais que os híbridos podem representar ao meio ambiente, podendo “contaminar geneticamente” estoques naturais ou cultivados, caso sejam férteis, ou ainda competir de diversas formas com as linhagens parentais. Logo, a identificação, a caracterização e o monitoramento genético de híbridos produzidos nas estações de reprodução de peixes são práticas de grande importância e devem acompanhar os programas de hibridação aplicados à piscicultura. Com o perfil genético desses animais conhecido, aliado a práticas corretas de manejo, os possíveis problemas decorrentes do uso de animais geneticamente manipulados podem ser evitados. Por outro lado, o resultado disto é a possibilidade de uso de indivíduos com boas características qualitativas, oferecendo produtos diferenciados para as pisciculturas, destinados ao consumo alimentar, pesca esportiva, produção de hipófises, e criadores de peixes ornamentais.

O fenômeno da hibridação é definido como uma fusão de dois patrimônios genéticos diferentes, cujos produtos podem apresentar caracteres taxonômicos intermediários. Considerando que a produção de híbridos interespecíficos de peixes seja atualmente uma prática comum, tanto no Brasil como na América do Sul em geral, torna-se necessário que programas efetivos de caracterização e monitoramento desses animais sejam postos em prática, para que se realize uma avaliação correta do uso desses indivíduos em projetos de piscicultura, sem proporcionar riscos para o meio ambiente. Outro problema relativo à produção de híbridos refere-se à avaliação de quais os reais riscos que esses animais apresentam para as populações selvagens e cultivadas das espécies parentais. Para isso, a determinação do tipo genético produzido, a identificação dos graus de fertilidade ou esterilidade e a caracterização morfogênética são as primeiras etapas a serem analisadas. De posse desses dados, pode-se avaliar a intensidade do impacto genético-ecológico decorrente da introdução dos híbridos e suas implicações nos programas de conservação dos estoques selvagens e cultivados das espécies parentais.

Os híbridos parcialmente férteis ou os que apresentam fertilidade total, são os que oferecem maiores riscos a populações parentais selvagens, pois podem realizar retrocruzamentos bem-sucedidos com os tipos

parentais, provocando contaminação genética dos estoques selvagens. Em longo prazo, as consequências são de difícil previsão, podendo ocorrer hibridações introgressivas, resultando em uma única população híbrida, levando espécies parentais à extinção.

Considerando que os estudos genéticos em híbridos interespecíficos ainda são escassos e, em sua maioria, não estão relacionados a projetos de cultivo, o presente estudo teve como objetivos principais caracterizar através de técnicas citogenéticas, a linhagem híbrida de exemplares de “tambatinga”, produzida atualmente em pisciculturas brasileiras e diferenciá-las de seus respectivos parentais *Colossoma macropomum* (tambaqui) e *Piaractus brachypomus* (pirapitinga). O “tambatinga” é um híbrido resultante do cruzamento entre fêmea de tambaqui e macho de pirapitinga, inicialmente desenvolvido no Brasil, em 1982, pelo DNOCS, no estado do Ceará, através do Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho von Ihering, município de Pentecoste. Na Venezuela, esses híbridos já foram encontrados em ambientes naturais, indicando que o cruzamento entre as duas espécies pode ocorrer sem a intervenção humana.

Na análise citogenética das amostras foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses preparações diretas de células renais e coloração das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) com nitrato de Prata. Para estimulação de mitoses foi utilizado uma técnica para obtenção de um maior número de mitoses, através da injeção de solução de fermento biológico que, para peixes, consiste em preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na proporção de 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada, incubar a solução em banho-maria (40°C) por cerca de 20 minutos e injetar esta solução dorso-lateralmente no peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal; deixar o animal em aquário bem areado de 24 a 48 horas. Nas preparações cromossômicas diretas foram feitas preparações de rins dos animais utilizando-se a técnica que consiste em injetar solução de colchicina a 0,025% por 50 minutos, retirar os tecidos dos animais e dissociá-los em uma placa de Petri, separar as células e hipotonizá-las por 21 minutos e fixá-las em banhos seguidos de solução fixadora de Carnoy. As suspensões celulares são pingadas em lâminas, deixadas para secagem ao ar, para serem posteriormente coradas. Para técnica de bandamento cromossômico para localização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs), foi empregada a técnica de coloração por Prata.

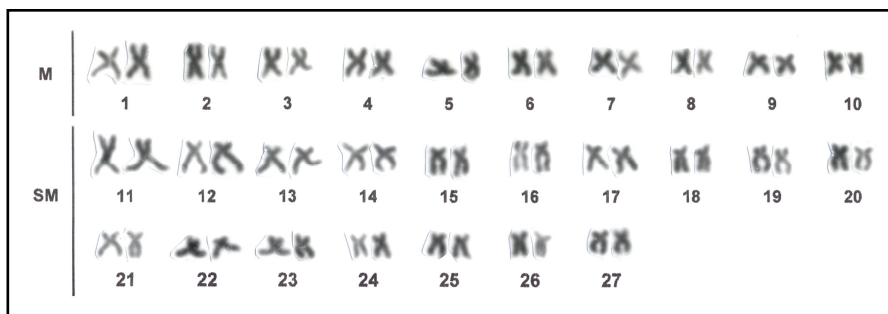
A partir da análise citogenética, foi observado em ambas as espécies parentais e também em seu respectivo híbrido, um número diplóide de  $2n=54$  cromossomos (Figuras 1, 2 e 3), sendo 10 pares de cromossomos metacêntricos e 17 pares de submetacêntricos. O número fundamental encontrado (NF) foi igual a 108, tanto para as espécies parentais como para o “tambatinga”.

Através da coloração por impregnação pela Prata, nos exemplares da espécie *Colossoma macropomum*, as NORs foram evidenciadas em 1 a 5 cromossomos, todas teloméricas, tanto em cromossomos do tipo meta, como em cromossomos do tipo submetacêntrico. Nas preparações cromossômicas dos exemplares da espécie *Piaractus brachypomus*, tratados pelo método de impregnação pela Prata, foram evidenciadas de 3 a 6 marcações de NORs todas terminais. Através dessa mesma técnica realizada em exemplares do híbrido “tambatinga”, foram evidenciadas de 1 a 6 marcações teloméricas. Nesse presente estudo, devido à ampla variação de NORs ativas encontradas, com polimorfismo numérico e morfológico, em ambas as espécies parentais *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* e também no seu híbrido “tambatinga”, não houve como identificar os indivíduos pelo método de impregnação por  $AgNO_3$ .

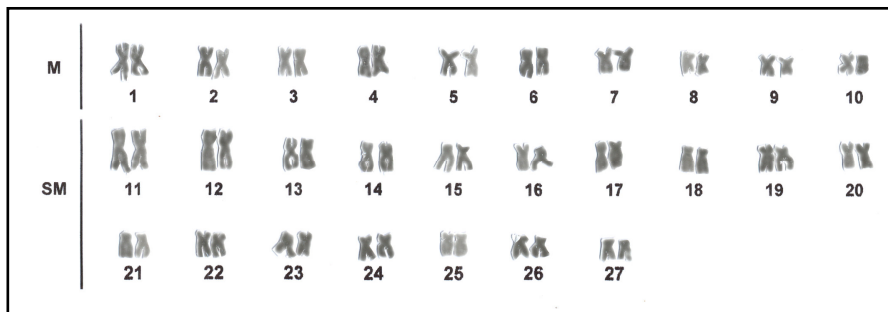
Pela técnica de bandamento C realizada em preparações cromossômicas de *Colossoma macropomum* analisados no presente trabalho, foi observada a presença de blocos heterocromáticos localizados em posição pericentromérica e telomérica em pares de cromossomos. Em *Piaractus brachypomus*, o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva caracteriza-se pela presença de blocos bem definidos na região pericentromérica de muitos pares cromossômicos, sendo observados também cromossomos com blocos heterocromáticos teloméricos e uma possível marcação intersticial, nos exemplares da amostra do

presente estudo. Também pela técnica de bandamento C realizada em preparações cromossômicas de exemplares de “tambatinga”, foi observada a presença de marcações teloméricas e pericentroméricas, além de uma possível marcação intersticial. Como os blocos encontrados até o presente momento são, em sua maioria, restritos às regiões teloméricas e centroméricas, essa característica não demonstra as exigências para um marcador citogenético diferenciado, que possa ser de utilidade na identificação das espécies. O possível par de cromossomos com blocos intersticiais encontrados em *Piaractus brachypomus* e no “tambatinga” poderá ser um marcador para diferenciar as espécies parentais e seu híbrido.

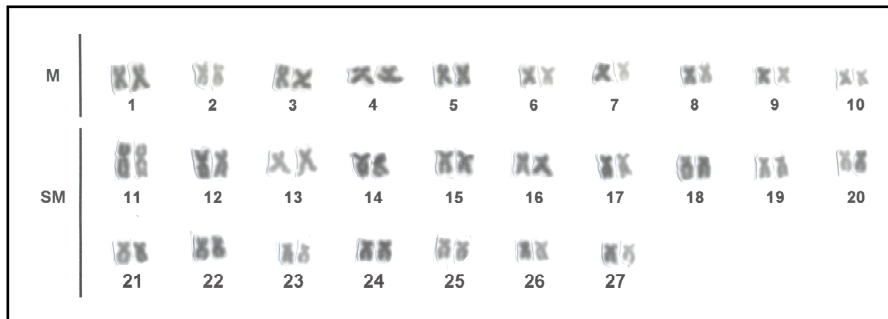
Para um estudo mais apurado, a aplicação de técnicas citogenéticas mais específicas para identificar as regiões organizadoras de nucléolos, poderá possibilitar melhor identificação e observação das NORs ativas e inativas. Esses estudos envolvendo genética aplicada a piscicultura poderão fornecer subsídios para o monitoramento de projetos de hibridação em pisciculturas, na orientação de programas de conservação biológica e um manejo adequado dos estoques naturais e cultivado de peixes.



**Figura 1** – Cariótipo de *Colossoma macropomum* (Tambaqui).  $2n=54$ .



**Figura 2** – Cariótipo de *Piaractus brachypomus* (Pirapitinga).  $2n=54$ .



**Figura 3**- Cariótipo do híbrido interespecífico “tambatinga”,  $2n=54$ .

## Referências bibliográficas:

- 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 Aquicultura/Brasil 3-7-76-0001-CIID), CEPTA, Pirassununga: 11-12.
- Bertollo LAC (1994) Bandeamento G em cromossomos de peixes. V Simp. Citogent. Evol. Aplic. Peixes Neotrop. p.78.
- Chevassus B (1983) Hybridization in fish. *Aquaculture* 33: 254-262.
- Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo, LF (1993) A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia* 49: 810-813.
- Gold JR, Li YC, Shipley NS, Powers, PK (1990) Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology* 37: 563-575.
- Howell WM & Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hubbs CL (1955) Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology* 4:1-20.
- Lozano R, Rejon CR, Rejon MR (1988) A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain Technology* 66(6): 335-338.
- Mayr E (1963) The breakdown of isolating mechanisms (hybridization). In: E. Mayr. *Animal species and evolution*, p. 110-135, Belknap Press, Cambridge, MA.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 41: 227-236.
- 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* 136: 227-230.
- Ryman N & Utter FM (1987) Population Genetics & Fishery Management. University of Washington Press, Seattle.
- Schweizer D (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.* 57: 1-14.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.* 75: 304-306.
- 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, 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.

**Bolsa:** FAPESP.