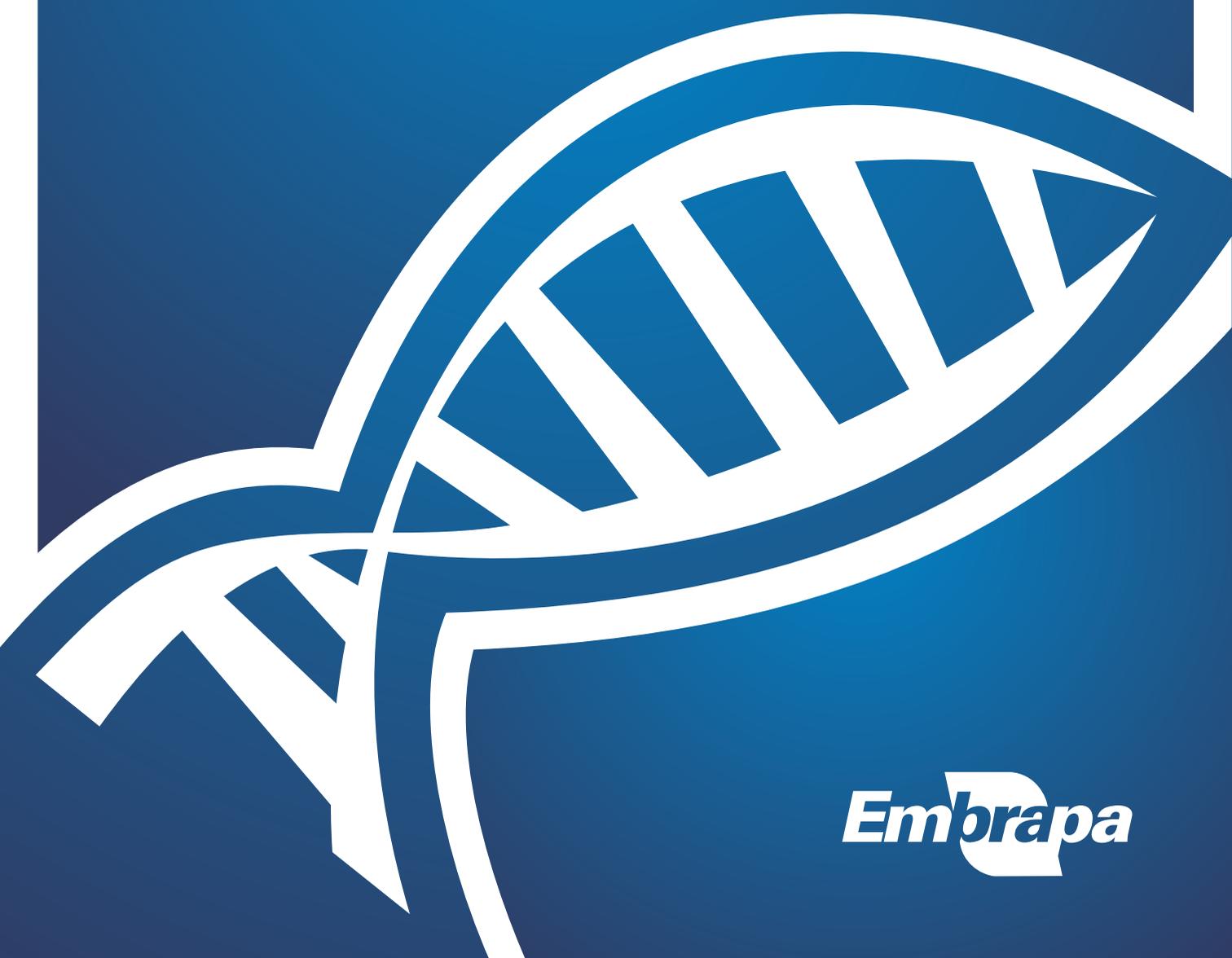


GENÉTICA NA PISCICULTURA

Importância da variabilidade genética,
marcação e coleta para análise de DNA



Embrapa

GENÉTICA NA PISCICULTURA

Importância da variabilidade genética,
marcação e coleta para análise de DNA

*Embrapa
Brasília, DF
2012*

**Exemplares desta
publicação podem ser solicitados a:**

Embrapa Pesca e Aquicultura

Av. Juscelino Kubitscheck, 164
Quadra 103 Sul, Térreo
Palmas, TO - Brasil
Fone: (63) 3218.2953
Fax: (63) 3218.2933
sac.cnpasa@embrapa.br
<http://cnpasa.sede.embrapa.br>

Carlos Magno Campos da Rocha

Chefe Geral

Ariovaldo Luchiari Junior

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Alexandre Aires de Freitas

Chefe-Adjunto de Transferência de Tecnologia

Neusa Alice dos Santos

Chefe-Adjunta de Administração

1ª Edição

1ª impressão (2012):
2000 exemplares impressos

Textos

Diogo Teruo Hashimoto

Anderson Luís Alves

Eduardo Sousa Varela

Giovanni Vitti Moro

Marina Keiko Pieroni Iwashita

Diagramação

Jefferson Cristiano Christofoletti

Comitê Local de Publicações

Ariovaldo Luchiari Junior

Renata Melon Barroso

Lucas Simon Torati

Viviane Rodrigues Verdolin dos Santos

Leandro Bortolon

Fábio Reynol de Carvalho

Deivison Santos

Flávia Tavares de Matos

Jefferson Cristiano Christofoletti

Thayana Abreu Viza Figueiredo

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pesca e Aquicultura

Cartilha de Genética na Piscicultura : Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. Brasília, DF : Embrapa, 2012.
32 p.: il.

ISBN 978-85-7035-107-4

1. Peixe. 2. Aquicultura. I. Embrapa Pesca e Aquicultura.

CDD 639.3

SUMÁRIO

05	Apresentação
07	Introdução
09	I- Análise de variabilidade genética
09	Importância para a piscicultura
11	Marcadores genéticos para análise de variabilidade genética
15	II- Marcação de peixes por tags
15	Tipos de marcações utilizadas em peixes
16	Instruções básicas para marcação por tags
18	Por que investir na marcação de peixes por tag?
21	III- Coleta de amostras biológicas para análise de DNA
21	Informações importantes
22	Preparação dos tubos coletores
23	Coleta de nadadeiras e transferência para o tubo coletor
27	Informações para preenchimento da planilha
27	Armazenamento das amostras
29	IV- Referências





APRESENTAÇÃO

Entre os setores centrais da pecuária, a piscicultura é a que mais necessita de desenvolvimento em nosso País. Enquanto as cadeias produtivas de aves, suínos e bovinos encontram-se consolidadas e com amplo domínio tecnológico em áreas essenciais e até em conhecimentos de ponta, as principais espécies de peixes nativos ainda têm de ser domesticadas.

Trata-se de um paradoxo. A produção brasileira de peixes não corresponde ao potencial hídrico do País com seu gigantesco litoral e bacias que compõem o maior volume fluvial do planeta. Tampouco a indústria nacional de pescado faz jus à imensa diversidade de espécies aquáticas nativas brasileiras.

Esta publicação é um passo valioso para melhorar os sistemas de produção da aquicultura brasileira. A genética é ferramenta chave da produção animal moderna. Dependeremos dela para conhecer a diversidade de nossos peixes, para melhorar nossos plantéis, aperfeiçoar o manejo e colocar produção aquícola brasileira em pé de igualdade com as mais avançadas do mundo e, quem sabe um dia, ultrapassá-las.

Aproveite bem este material, pois ele vale ouro, para você e para o Brasil.

Carlos Magno Campos da Rocha
Chefe Geral da Embrapa Pesca e Aquicultura



INTRODUÇÃO

O cultivo de peixes é considerado um setor de produção em franco crescimento. De acordo com estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura de 2012, a aquicultura no Brasil (continental e marinha) registrou expressivo desenvolvimento no período de 2008-2010, com crescimento de 31,2% durante este triênio. O cultivo de peixes no Brasil para a piscicultura comercial visando o abastecimento de restaurantes, supermercados e fábricas de processamento foi estabelecido somente na década de 1990, o que trouxe consideráveis mudanças na demanda do consumidor. Esse cenário ocasionou melhorias na piscicultura nacional, principalmente através de investimentos que surgem no setor. Conseqüentemente, no Brasil há grande exigência por peixes de melhor qualidade, o que mostra a imediata necessidade de aplicação de tecnologias genéticas.

Com aumento da demanda por alimentos da aquicultura, surgiu a necessidade de sistemas de produção mais eficientes. As principais melhorias foram alcançadas por meio de processos avançados de cultivo, melhoria na nutrição, aperfeiçoamento do diagnóstico e terapias de doenças e, especialmente, da aplicação da genética para características de produção. Em âmbito internacional, várias espécies aquícolas têm sido melhoradas por meio de tecnologias genéticas, tais como a tilápia, salmão e bagre americano. Entretanto, para as espécies nativas brasileiras, poucas ferramentas genéticas foram utilizadas e maiores ganhos poderão ser alcançados.

A pesquisa genética e sua aplicação têm desempenhado papel significativo no desenvolvimento da aquicultura, e o impacto será cada vez mais importante à medida que a aquicultura se desenvolve.

Embrapa
Pesca e Aquicultura



I - ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA

Importância para a piscicultura

Os processos de domesticação e a maioria dos sistemas de cultivo de animais levam à perda natural de variabilidade genética dos estoques. Entretanto, especialmente na piscicultura brasileira, há uma tendência dos plantéis de matrizes serem formados por peixes que possuem baixa variabilidade genética ou alto grau de parentesco, por exemplo, animais que são irmãos (consanguinidade). Assim como em outros animais, inclusive no homem, quando animais aparentados acasalam há um risco maior de nascerem filhos com sérios problemas biológicos, que é um processo denominado de depressão por consanguinidade ou endogamia. Nesse caso, o nascimento de animais defeituosos, com problemas de má formação e de baixa capacidade produtiva é frequente. Esse processo ocasiona uma diminuição da produtividade na piscicultura. Na piscicultura brasileira, isso se deve principalmente aos seguintes fatores:

- formação de lotes de reprodutores a partir de estoques já endogâmicos de outras pisciculturas;
- falta de controle da reprodução e desconhecimento da origem dos animais;
- falta de recursos para obtenção de matrizes de boa qualidade genética;
- utilização de baixo número de reprodutores;
- carência de profissionais especializados na piscicultura;
- ausência de programas de monitoramento de endogamia.

A depressão por consanguinidade resulta do fato de indivíduos biologicamente aparentados terem maior chance de possuírem genes

recessivos deletérios. Processos de endogamia sem monitoramento e planejamento podem desvalorizar um estoque, devido à uma redução da viabilidade, aumento de anormalidades e consequente prejuízo para os piscicultores, que apresentarão peixes de baixa qualidade. A probabilidade de anomalias biológicas aumenta quando os pais são mais aparentados, ou seja, quanto maior for o nível de consanguinidade dos parentais. As principais evidências de altos níveis de endogamia são:

- diminuição da taxa de crescimento;
- baixa taxa de sobrevivência;
- maior susceptibilidade às doenças;
- defeitos na formação dos opérculos (Figura 1a);
- deformidades na coluna vertebral (Figura 1b, c).

“Nos estoques utilizados em piscicultura, existem três formas para estimar os níveis de consanguinidade dos animais: genealogia, método do número de parentais e marcadores genéticos”.

Devido aos prejuízos que podem acarretar para os produtores de peixes, há uma necessidade de monitoramento da variabilidade genética. Assim, com a informação do perfil genético desses animais, em conjunto com práticas adequadas de manejo genético, pode-se reduzir e até evitar os principais problemas resultantes do uso inadequado de animais em programas de produção. Mesmo quando os estoques cultivados são formados por peixes selvagens, o processo de endogamia deve ser monitorado e evitado, pois geralmente uma baixa amostragem de peixes coletados não representa a variabilidade genética natural e os acasalamentos são realizados sem qualquer critério de seleção.

Desta forma, nos estoques utilizados em piscicultura, existem três formas para estimar os níveis de consanguinidade dos animais: genealogia, método do número de parentais e marcadores genéticos. Dentre estes, os marcadores genéticos mostram-se mais vantajosos por possibilitarem cálculos relativos de consanguinidade acumulada, sem que haja necessidade de conhecimento prévio a respeito da genealogia ou do número de reprodutores efetivamente usados por geração nos sistemas de cultivo.

(a)



(b)



(c)



Figura 1. Peixes com deformidades devido aos altos níveis de endogamia. (a) malformação dos opérculos, evidenciado pela seta. (b) e (c) deformidades da coluna vertebral, com vistas lateral e superior, respectivamente. Fotos: Diogo T. Hashimoto e Fábio Porto-Foresti.



Marcadores genéticos para análise de variabilidade genética

A variabilidade genética pode ser estimada através da análise de DNA (conhecidos como marcadores genéticos), similar ao teste de paternidade que é realizado em humanos. Esse tipo de análise permite estimar o nível de parentesco entre os animais, por meio de comparações das variações nas sequências de DNA. Em um estoque de peixes que tenha baixa variabilidade genética, há uma probabilidade maior de que os animais tenham algum parentesco.

“A marcação dos peixes por tags e a coleta de material biológico são técnicas importantes e que todo produtor pode realizar.”

Estabelecer níveis de variabilidade genética em pisciculturas é o primeiro passo para investir em programas de melhoramento genético, pois possibilita direcionar os cruzamentos e produzir alevinos de melhor qualidade. Com o conhecimento destas relações o produtor poderá realizar a programação da reprodução em arranjos de acasalamento desejáveis, escolher reprodutores em função de suas aptidões genéticas e zootécnicas, além de poder agregar valor econômico aos seus peixes.

Para a análise de variabilidade genética através de marcadores de DNA, é necessário inicialmente realizar duas práticas fundamentais: marcação dos peixes por tags e coleta de material biológico. Estas duas práticas serão tratadas aqui, pois são técnicas que todo piscicultor pode realizar, além de necessitar pouco manejo dos animais. Uma vez realizadas estas duas etapas iniciais, os materiais biológicos podem ser analisados por laboratórios especializados, tais como o da Empresa Pesca e Aquicultura e parceiros.



I- MARCAÇÃO DE PEIXES POR TAGS

Tipos de marcações utilizadas em peixes

A prática da marcação individual de peixes está cada vez mais crescente na piscicultura brasileira. Vários métodos estão disponíveis e são utilizados no cotidiano dos produtores. Qualquer forma de identificação dos peixes pode ser utilizada como marcadores, ou seja, até mesmo o simples corte de um raio de nadadeira pode ser aplicado para marcações temporárias.

No entanto, as marcações mais simples são informativas para um grupo reduzido de animais. Métodos mais sofisticados podem ser utilizados em um grande número de animais, pois requerem a marcação através de um objeto específico, que envolve a inserção ou fixação no corpo do peixe. Esses marcadores podem ser de diferentes tipos como etiquetas plásticas (presilhas), metais ou eletrônicos, de diferentes cores, números e letras, e podem ser presos nas nadadeiras, músculo, mandíbula, cauda e opérculo (estruturas que cobrem as brânquias).

Obviamente, para maior praticidade são recomendáveis os métodos de identificações que sejam de baixo custo e de fácil aplicação. Além disso, outros importantes aspectos para as marcações devem ser atendidos:

- o método deve ser aplicável para peixes pequenos;
- a marcação não deve influenciar a taxa de crescimento do animal;
- o método deve ser pouco agressivo para o peixe;
- a marcação deve permanecer no peixe por longo período;
- o método de marcação deve exigir pouco trabalho;
- a marcação deve ser legível após o momento do registro.

Porém, é difícil encontrar algum tipo de marcação que atenda todas estas características. A marcação mais indicada é através de tag ou PIT-tag (Passive Integrated Transponder), que podem ser inseridos no músculo ou na cavidade visceral do peixe por meio de uma seringa. O tag implantável tem dimensões pequenas (do tamanho de um grão de arroz) e não precisa de bateria (Figura 2a), proporcionando assim uma identificação segura e permanente para os criadores de peixes. O tag possui um código numérico único e permite ser identificado utilizando-se um aparelho leitor. No momento da leitura, é exibido um formato numérico ou alfanumérico, que é atribuído para identificação de cada peixe marcado.

“Inserido corretamente, o tag não causa infecção nem altera a taxa de crescimento dos peixes”

Instruções básicas para marcação por tags

A marcação por tag é um processo simples, eficaz e de poucos relatos de mortalidade para os peixes. Também se sabe que o tag não causa nenhum tipo de infecção e nem altera a taxa de crescimento dos peixes, desde que seja implantado corretamente. O implante dos tags deve ser realizado da seguinte forma:

1. anote previamente o número do tag a ser inserido no peixe;
2. introduza cuidadosamente o tag na agulha da seringa (aconselha-se utilizar o tag esterilizado). A seringa é desenvolvida especialmente para este tipo de tag implantável;
3. deixar o peixe anestesiado, para facilitar o implante;
4. localize o local de inserção, adjacente à nadadeira dorsal, padronizando-se o lado direito do peixe (Figura 2b). Este local é escolhido como padronização porque possibilita uma rápida leitura do tag. O tag pode ser aplicado em outros locais no peixe, ou até mesmo na cavidade visceral, mas caso seja aplicado em locais distintos para cada peixe, a leitura será dificultada;

5. limpe a região com álcool 70% (70 ml de álcool puro e 30 ml de água) ou álcool iodado, com o auxílio de um borrifador para desinfetar o local de implante do tag. Esta ação diminuiu os riscos de infecções se instalarem;

6. introduza a ponta da seringa sob uma escama e insira até o final, paralelamente ao corpo do peixe (Figura 2c);

7. empurre totalmente o êmbolo da seringa, para alojar de forma segura o tag;

8. mantenha o local de inserção pressionado com o dedo, enquanto a agulha é suavemente retirada;

9. borrife novamente a região com álcool 70% ou álcool iodado para evitar infecções;

10. verifique se a implantação foi bem sucedida, através da leitura do tag pelo aparelho leitor (Figura 2d), e coloque imediatamente os peixes marcados em água aerada. Recomenda-se deixar os peixes por 10 minutos em uma local que contenha água com sal comum (NaCl), na quantidade de 2 g para cada litro, para auxiliar no retorno ao equilíbrio osmótico do peixe e estimular a produção de muco pela pele.

“Antes de utilizar novamente a seringa, certifique-se que ela foi limpa com álcool 70% para evitar a propagação de doenças.”

OBS: Antes de utilizar novamente a seringa, certifique-se que ela foi limpa com álcool 70% (70 ml de álcool puro e 30 ml de água), para evitar a propagação de doenças.

A única desvantagem dos tag é o limitado uso para peixes de porte pequeno, pois logo após a inserção do tag pode-se gerar uma lesão no local e o tag poderá ser expelido, impedindo o sucesso da marcação.

(a)



(b)



(c)



(d)



Figura 2. Processo de implante do tag no peixe. (a) material usado para marcação dos peixes com tags, e em destaque o tag. (b) local aonde deve ser inserido o tag. (c) inserção da agulha até o final. (d) leitura pelo equipamento leitor. Fotos: Jefferson Christofolletti.

Por que investir na marcação de peixes por tag?

Vários são os benefícios da identificação individual de peixes por tag. Podemos destacar as seguintes aplicações:

Gerenciamento zootécnico e manejo: permite o monitoramento individual do peso, tamanho, idade, comportamento, época de reprodução, controle reprodutivo e desempenho de desova. Assim, o desempenho de cada indi-

víduo pode ser avaliado, o que permite escolher os melhores peixes para produção e possibilita iniciar processos de seleção para programas de melhoramento genético.

Identificação sexual: grande parte dos peixes que são cultivados na piscicultura comercial não apresentam dimorfismo sexual externo (diferenças visíveis entre os sexos), o que normalmente torna difícil diferenciar fêmeas e machos. Portanto, uma vez identificado o sexo no período reprodutivo, é possível a rápida identificação sexual via leitura do tag, reduzindo tempo e aumentando a eficiência no processo de reprodução induzida.

Monitoramento genético: após a marcação individual, é possível realizar análises genéticas nas matrizes, tanto para identificar a pureza dos peixes quanto para verificar o nível de endogamia (plantel formado por irmãos) dos reprodutores. Com o reconhecimento de cada indivíduo, é possível realizar uma genealogia para cada peixe, o que evitará cruzamentos endogâmicos. Isto permitirá o melhor direcionamento dos cruzamentos, que maximizem o potencial genético dos peixes e, conseqüentemente, aumentem a produção.

Rastreabilidade: uma das grandes vantagens dos tags é a possibilidade de certificação de origem do produto, pois o peixe poderá ser rastreado desde a origem dos seus parentais, a fase de alevinos, engorda, até o produto final (filés ou produtos processados industrialmente). Com isso, pode-se agregar valor ao produto, o que trará benefícios tanto para o consumidor quanto para o produtor.

A marcação de peixes por tag é uma metodologia de uso crescente e está sendo adotada por várias pisciculturas brasileiras. Considerado de baixo custo, o principal ganho com este investimento é a possibilidade de um acompanhamento completo dos plantéis de peixes que estão sendo cultivados, permitindo maior eficiência na produção e rentabilidade.

“De baixo custo, a marcação por tag permite um acompanhamento completo dos plantéis, maior eficiência e rentabilidade”.



III- COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA ANÁLISE DE DNA

Informações importantes

As amostras a serem coletadas para estudos de DNA devem ser apenas de peixes vivos, congelados, ou sob efeito de anestésico. Inicialmente, deve ser decidido o número de animais a serem amostrados, e em seguida preparar o mesmo número de tubos coletores com a identificação necessária. O DNA não poderá ser obtido com a qualidade necessária se as amostras tiverem sido fixadas ou expostas a formol.

Não é necessário o uso de luvas cirúrgicas, mas as mãos do coletor devem ser limpas com água para retirar o muco e/ou escamas de peixe entre cada manipulação, assim como a tesouras e pinças devem ser lavadas em álcool 70% entre cada coleta de amostras de cada peixe. Essas medidas visam minimizar a chance de contaminação cruzada (amostra de DNA de duas espécies diferentes ou dois indivíduos no mesmo tubo), e assim produzir resultados errôneos nas análises genéticas, além de evitar a propagação de doenças entre os peixes. Quaisquer parasitas visíveis devem ser removidos dos tecidos, com o auxílio de pinças, canivetes, bisturis e tesouras, pois podem contaminar a amostra e afetar as análises genéticas.

O material a ser utilizado no procedimento de amostragem deve ser preparado antes do início do processo, como identificação dos tubos,



Figura 3. Material usado para a coleta e armazenamento da nadadeira. Foto: Jefferson Christofolletti.

Preparação dos tubos coletores

Cada peixe deverá ter o tecido (nadadeira) coletado e armazenado separadamente em tubos plásticos individuais do tipo eppendorf (Figura 4).

Para isso:

1. identifique com um número cada tubo (com o uso de lápis), para que cada amostra possa ser identificada no laboratório. As marcações no tubo podem ser feitas a lápis diretamente no tubo, ou preferencialmente com o uso de adesivos. Atenção: não utilizar caneta direto sobre o tubo, pois o álcool poderá apagar a marcação.

“Não é necessário o uso de luvas cirúrgicas, mas as mãos devem ser limpas com água entre cada manipulação.”

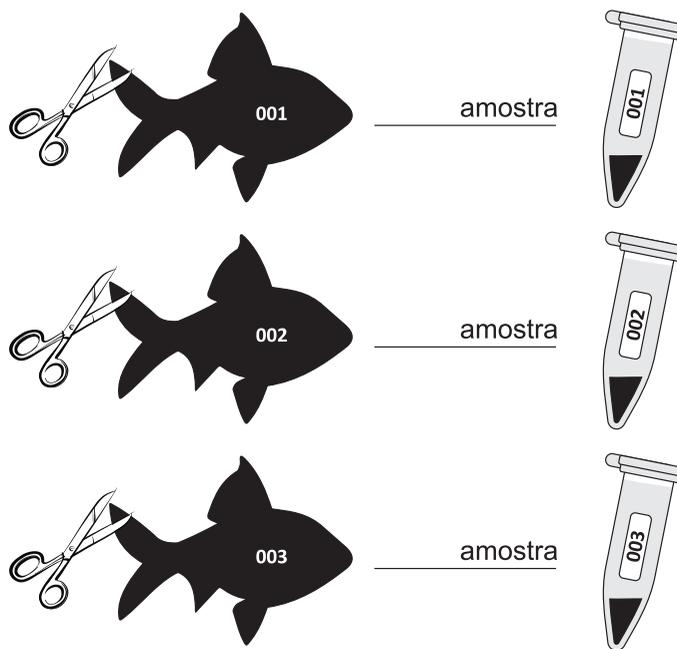


Figura 4. Esquema de coleta e individualização de amostras. Fonte: Anderson Luís Alves.

2. o número usado para identificação de cada tubo deve corresponder exatamente às informações contidas na planilha (visite o site: www.embrapa.br/cnpasa) que deverá acompanhar os tubos enviados ao laboratório.

3. preencha os tubos até o topo com álcool comum de farmácia (92,8°) e adicione a etiqueta com numeração individual para cada tubo. O álcool é utilizado para a preservação do material genético (DNA) da amostra.

Coleta de nadadeiras e transferência para o tubo coletor

Antes de iniciar o procedimento de coleta da nadadeira e marcação individual com tag, é necessário anestesiá-los. A partir daí, segue-se com os seguintes procedimentos:

1. recomenda-se limpar a região com álcool 70% ou álcool iodado, com o auxílio de um borrifador para desinfetar a pele do peixe e evitar os riscos de infecções;

2. corte um pequeno pedaço de tecido da nadadeira caudal (preferencial) do peixe usando uma tesoura limpa. O tamanho ideal do tecido deve estar em torno de 1,5x2 cm (Figura 5). Se o peixe for pequeno, a amostra poderá ser de tamanho inferior ao sugerido.

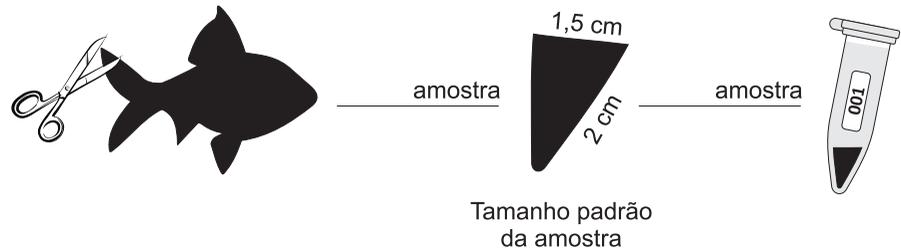


Figura 5. Indicação de tamanho de tecido para as análises genéticas. Fonte: Anderson Luís Alves.

3. coloque a amostra de nadadeira no tubo plástico contendo álcool comum de farmácia (92,8°) (Figura 6). O álcool preserva o tecido e, conseqüentemente, o DNA, de modo que não é necessário ser refrigerado. É fundamental que as amostras de tecido sejam completamente imersas no álcool e não fiquem expostas ao ar dentro do tubo;

4. borrife novamente a região com álcool 70% ou álcool iodado para evitar infecções;

5. coloque imediatamente os peixes marcados em um local aerado contendo água com sal comum (NaCl), na quantidade de 2 g para cada litro, durante 10 minutos.

OBS: Antes de utilizar novamente o material cirúrgico, certifique-se que ele foi limpo com álcool 70%, para evitar a propagação de doenças (Figura 7).

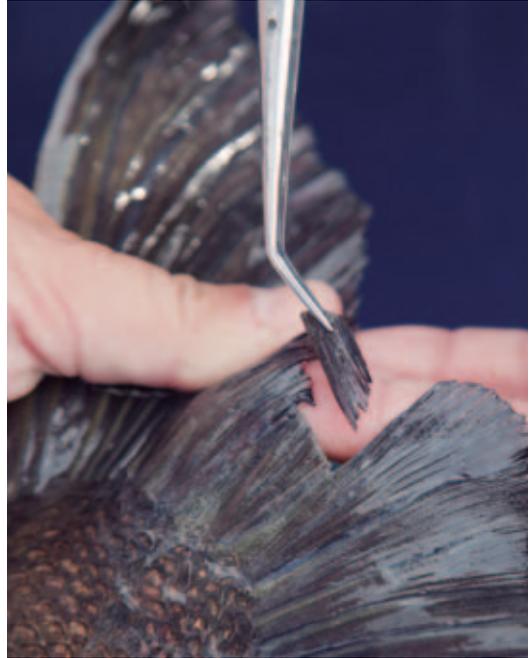
O animal amostrado para análises genéticas deverá receber marcação individual logo após a coleta da nadadeira. O peixe deve ser marcado com tag e o número correspondente ao tag deverá ser anotado na planilha de identificação da amostra.

“Antes de iniciar a coleta da nadadeira ou a marcação com tag, é necessário anestésiar os peixes.”

(a)



(b)



(c)

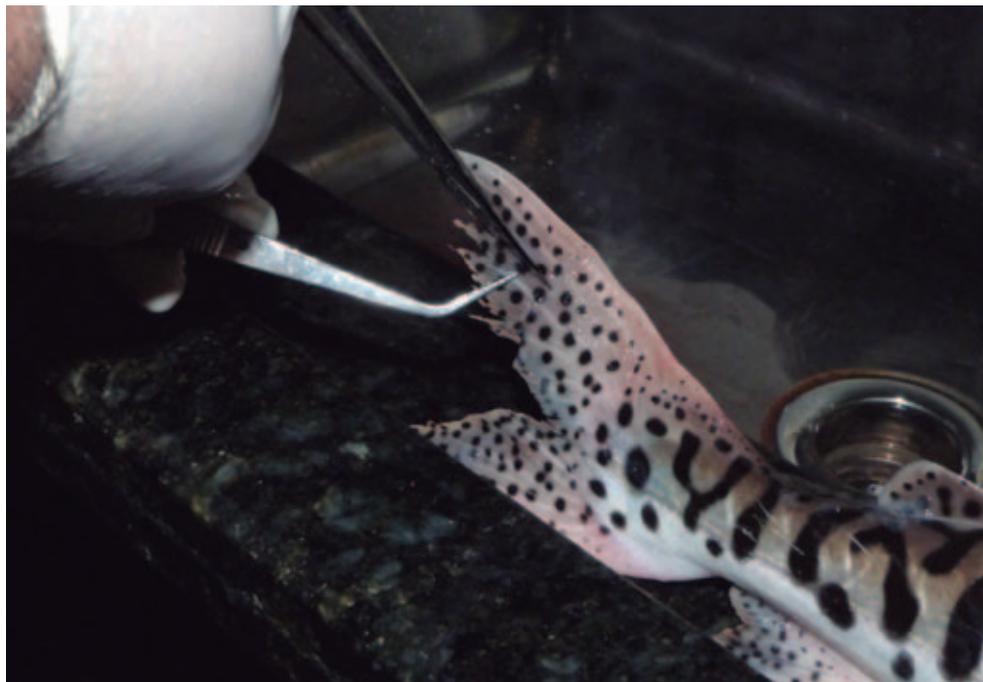


(d)



Figura 6. Coleta de nadadeira caudal para análises de DNA. (a) e (b) corte da nadadeira. (c) e (d) fixação do fragmento de nadadeira no tubo. Fotos: Jefferson Christofoletti.

(a)



(b)



Figura 7. (a) Coleta de nadadeira caudal e (b) limpeza de material cirúrgico. Foto: Anderson Luís Alves.

Informações para preenchimento da planilha

Junto ao material coletado deve ser preenchida uma planilha (disponível no site: www.embrapa.br/cnpasa) com as informações de cada animal amostrado. A planilha deverá conter as seguintes informações:

1. **Procedência:** local da coleta (responsável, endereço e contato), se possível incluir a origem dos animais.
2. **Data:** informar a data da coleta do material
3. **Espécie:** Nome popular (se possível nome científico)
4. **Sexo:** M-macho e F-fêmea (quando possível identificar)
5. **Identificação da amostra:** (número do tubo)
6. **Identificação individual:** (número do tag)
7. **Observações:** (outras informações relevantes sobre o peixe que o piscicultor julgar importante)

Armazenamento das amostras

As amostras coletadas podem ser mantidas em temperatura ambiente, mas devem ser mantidas fora do extremo sol / calor, pois podem causar danos ao DNA e prejudicar a análise genética. Preferencialmente, as amostras podem ser armazenadas em caixas plásticas em um refrigerador ou freezer.

Após a coleta de material biológico dos peixes, é necessário entrar em contato com a Embrapa Pesca e Aquicultura, pelo Serviço de Atendimento ao Cidadão (sac.cnpasa@embrapa.br), para receber instruções de como proceder com o material coletado. De acordo com a demanda e disponibilidade, serão realizadas análises genéticas do estoque de reprodutores, incluindo diagnóstico e aconselhamento genético.

L·PIX



Locus
Molecular Imaging

A control panel featuring a small digital display, two large black buttons with red indicator lights, and a red emergency stop button. The text "Locus" and "Molecular Imaging" is printed on the panel.

IV- REFERÊNCIAS

GJEDREM, T. (Ed.). **Selection and breeding programs in aquaculture**. Dordrecht: Springer, 2005. 381 p.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. da C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 2. ed. Maringá: Eduem, 2002. 305p.

TOLEDO-FILHO, S. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; CALCAGNOTTO, D.; SANTOS, S. B. A. F.; BERNARDINO, G. **Cadernos de Ictiogenética 4: programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura**. São Paulo: USP, 1998. 56 p.

TOLEDO-FILHO, S. A.; CALCAGNOTTO, D.; BERNARDINO, G.; FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; MOYSÉS, C. B.; ALMEIDA-TOLEDO L. F.; FORESTI, F. **Cadernos de Ictiogenética 5: projeto de bancos genéticos na piscicultura brasileira**. São Paulo: USP, 1999. 53 p.







Embrapa Pesca e Aquicultura
Av. Juscelino Kubitscheck, 164
Quadra 103 Sul, Térreo | Palmas, TO - Brasil
Fone: (63) 3218.2953 | Fax: (63) 3218.2933
sac.cnpasa@embrapa.br
<http://cnpasa.sede.embrapa.br>



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

