

Categoria

**Trabalho Acadêmico / Artigo Completo**

## **PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA A ANÁLISE CITOGENÉTICA DE UMA LINHAGEM SELECIONADA DE LEBISTE (*Poecilia reticulata*)**

**Alex Sandro Victor Leite**<sup>1</sup>

**Camila Dutra de Souza**<sup>2</sup>

**Antonio Fluminhan Junior**<sup>3</sup>

**RESUMO:** O lebiste ou “guppy” (*Poecilia reticulata*) é um peixe ornamental de expressivo valor comercial e elevado número de associações de criadores no Brasil e no mundo. Esta espécie pode também desempenhar o papel de bioindicador da qualidade ambiental, o que revela a sua significativa importância para o meio ambiente. Embora a espécie seja mundialmente conhecida, ainda há uma carência de estudos genéticos básicos. A presente pesquisa visa o desenvolvimento do potencial genético da espécie, através da padronização de metodologias que envolvam a análise das suas características cromossômicas. Para estas investigações, foram empregados exemplares da linhagem Moscow originárias de uma criação comercial com reconhecido destaque a nível nacional. Para a análise citogenética, os melhores resultados foram obtidos com testes dos machos adultos, que apresentam maior facilidade para a observação dos cromossomos. Preparações realizadas com o auxílio de enzimas proteolíticas permitiram a observação de uma elevada

---

<sup>1</sup> Graduando de Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE.  
alex@fct.unesp.br

<sup>2</sup> Graduanda de Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE.  
camiladutrasouza@hotmail.com

<sup>3</sup> Professor – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE.  
fluminhan@unoeste.br

freqüência de configurações em metáfases. Preparações citológicas coradas com os corantes: Giemsa a 1%, Carmim-acético 45% e Reagente de Schiff, revelaram o predomínio de cromossomos acrocêntricos. Diversas configurações demonstraram a ocorrência de variações no grau de ploidia em um mesmo animal, indicando que a dimensão corpórea pronunciada dos mesmos está possivelmente associada com a elevação nos seus níveis de ploidia. A intensificação das análises indica uma perspectiva muito promissora para o estudo genético da espécie.

**Palavras chave:** Análise citogenética, lebiste, *Poecilia reticulata*

## 1. INTRODUÇÃO

O lebiste (*Poecilia reticulata*), mundialmente conhecido como guppy, é um peixe ornamental intensivamente criado e de grande valor comercial no Brasil e mundo. Segundo Winge (1922<sup>a</sup>), a espécie foi descoberta pelo Europeu Wilhelm C. H. Peters em 1805, que conferiu o nome científico de *Poecilia reticulata*. Conforme o mesmo autor, o nome 'guppy' vem do reverendo inglês Robert John Lechmere Guppy, que enviou de uma ilha da América do Sul em 1860 um exemplar deste peixe para o British Museum que, por sua vez, batizou de "Girardinus guppy" em sua homenagem.

Atualmente já existem centenas de linhagens criadas e fixadas (mantidas geneticamente puras), por criadores internacionais e algumas também fixadas e mantidas por criadores nacionais (Radionova, M.I., 1996). Os lebistes são originários da América do Sul e Central, mais precisamente de estuários localizados em Barbados, Trinidad Tobago, Venezuela, Guianas e porção norte do Brasil.

Ela é uma espécie de reprodução ovovivípara (Winge 1922 a, b) e, devido à sua beleza e grande potencial genético, no Brasil e no mundo foram criadas associações de criadores visando a melhoria genética da espécie e competições em exposições anuais entre os criadores (<http://www.ccg.org.br/>).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O melhoramento genético de guppy está sendo desenvolvido há várias décadas (Winge, 1922<sup>a</sup>), e resultou na criação de inúmeras linhagens com variações de coloração, formato e tamanho. Entretanto, poucos estudos aos níveis citogenéticos e genéticos dessa espécie têm sido realizado no Brasil, (Radionova, M.I., 1996), em comparação a nível internacional.

A grande maioria das pesquisas relatadas demonstra que as análises foram e estão sendo feitas com base na avaliação do fenótipo, o que provoca, em curto prazo de tempo, a perda dos padrões das linhagens por falta de conhecimento de suas características hereditárias (<http://www.ccg.org.br/>).

A análise citogenética possibilita o estudo das alterações estruturais e numéricas dos cromossomos, tais como: translocações, deleções, manifestações citogenéticas de amplificação gênica, além de perdas ou ganhos de cromossomos inteiros (Kumar, et al., 2000). Os estudos cromossômicos e a determinação do cariótipo permitem o fornecimento de subsídios de grande importância para o melhoramento genético e para o manejo das espécies.

Existe evidência genética de extensa base de um sistema de determinação do sexo XY em guppy, sugerindo que uma região limitada, não-recombinante do cromossomo Y do guppy abriga o locus do sexo masculino, determinante na ligação genética relativa para machos e genes ornamentais vantajosos (Winge 1922 a, b, 1927; Winge & Ditlevsen 1947; Haskins et al. 1970). Os marcadores definem 23 grupos de enlace, que correspondem ao número haplóide conhecido de cromossomos da espécie (Tripathi, 2008).

A espécie apresenta um pronunciado dimorfismo sexual de tamanho corporal e enfeites nupciais que são expressos exclusivamente em machos adultos. Uma fração substancial dos genes ornamentais é fielmente transmitida de pai para filho, em cada geração e pode, portanto, representar genes ornamentais masculinos vantajosos ligados ao cromossomo Y de guppies selvagens (Winge 1927; Haskins et al. 1970). Outro conjunto de genes ornamentais pode ser herdado da mãe, mas sua expressão é muito limitada aos filhos (Khoo 1999a, b, c).

Algumas características ligadas ao sexo têm sido mapeadas por marcadores moleculares, os quais foram utilizados para gerar mapas de ligação parcial para esta espécie (Khoo et al. 2003; Watanabe et al. 2005; Shen et al. 2007). Mapas genéticos são, portanto,

necessários e permitem o mapeamento de locos de características quantitativas (QTL) (Lander & Botstein 1989; Leder et al. 2006; Shirak et al. 2006).

Alguns estudos também têm demonstrado um mapeamento genético dos padrões de cores diferentes para os cromossomos sexuais, usando cepas ornamentais do guppy (Khoo et al. 1999 a, c). Mapas adicionais de ligação para o genoma parcial do guppy foram construídos (Foo et al. 1995; Khoo et al. 2003), com o auxílio de DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD), pela amplificação de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e marcadores de microssatélites (Watanabe et al. 2005; Shen et al. 2007).

Mapas de ligação detalhados e completos de guppy, com polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) de marcadores ligados a expressão de genes codificadores de proteínas (tag de seqüência expressa, ou EST) ou cromossomo artificial bacteriano (BAC) de clones genômicos, mostram que os guppies machos apresentam altos níveis de variabilidade fenotípica e genética para diversas características, como tamanho, forma e cor (Reznick & Endler 1982; Houde & Endler 1990; Endler 1995; Brooks & Endler 2001a; Hughes et al. 2005; Lindholm et al. 2005).

Além de uma série de estudos ecológicos e evolutivos, os guppies foram estudados historicamente como um sistema modelo para a herança ligada ao sexo de uma variedade de traços masculinos ornamentais importantes para a seleção sexual e de adaptação em populações naturais. A evolução do comportamento reprodutivo tem demonstrado a existência de várias estratégias adaptativas da espécie no meio selvagem é especificamente dirigido por um delicado equilíbrio de forças natural e sexual seletiva. Uma variedade de estudos sobre estes aspectos da biologia já gerou uma base para estabelecer esta espécie como um sistema modelo para análise evolutiva (Houde & Endler 1990 a).

### 3. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Entre os principais problemas encontrados em programas de melhoramento genético de guppies podem ser citados: a) dificuldades no melhoramento baseado unicamente no fenótipo devido ao relativo desconhecimento da base genética de herança

das características; b) dificuldade em discernir entre efeito genético x efeito ambiental ou fisiológico; c) Infertilidade em algumas linhagens (principalmente albinas); d) Reversão sexual espontânea, e) Surgimento esporádico de mutações. A relativa escassez de estudos sendo realizados no Brasil impede a resolução da maioria destes problemas.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Embora a realização de cruzamentos controlados e seleção de novas linhagens desta espécie estejam sendo desenvolvidos há várias décadas, resultando em criação de inúmeras variações de coloração, tamanho e formato, nota-se uma relativa inexistência de referencial teórico sobre melhoramento genético em lebistes. Mesmo considerando a grande demanda pelo conhecimento desta espécie já existente no Brasil.

A espécie é considerada a segunda espécie de peixe ornamental mais comercializado no Brasil, além de existir várias exposições de lebiste a nível nacional e internacional.

A escassez de dados referentes à genética da espécie no Brasil, constatado em um extenso levantamento bibliográfico, aliada à importância comercial da espécie a nível mundial, incentivam e justificam a realização da presente pesquisa.

#### 5. OBJETIVOS

O presente trabalho visa estabelecer as bases para o desenvolvimento do potencial genético desta espécie, a partir da utilização de metodologias que envolvem uma gama de informações genéticas e citogenéticas, em uma criação comercial plenamente estabelecida.

Serão avaliados os principais fatores em consideração ao melhoramento genético e os cuidados exigidos para três segmentos primários de uma criação: a) Manutenção da pureza genética de uma linhagem; b) Criação de novas linhagens a partir do intercruzamento de linhagens pré-existentes; c) Identificação de mutações promissoras para o desenvolvimento de novas linhagens.

Para tanto, esta pesquisa se propôs ao estudo básico da genética da espécie, em especial, a análise das características citogenéticas da espécie. Esta pesquisa envolveu a padronização da técnica para observação e identificação de características cromossômicas. Esta pesquisa também objetivou a verificação de uma hipótese preliminar de possível ocorrência de poliploidia em linhagens selecionadas desta espécie.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. Material biológico

O material biológico empregado foi obtido de uma criação com 27 linhagens puras, que são elas: Blue Grass, Blue Grass albino, Blue diamond, Full red, Full red albino, Hb pastel, Hb pastel long fin, Red head albino, Full Black long fin ribbon, Hb red albino, Moscow blue, Moscow purple, Moscow albino, Mikariff yellow, Metal snakeskin green, Metal red lutino, Metal yellow albino, Red Grass, Red Grass albino, Hb black, Red lace snakeskin albino, Red lace snakeskin, Snakeskin green, Moscow Full Black, Full White Albino Platinum, Gold Red, Mikariff Yellow Albino . Além destas, outras seis linhagens, tidas como puras, mas que foram fixadas em estufas de criação: Moscow blue long fin swallow, Moscow blue albino long fin swallow, Metal snakeskin long fin ribbon, Snakeskin green long fin ribbon e Red lace snakeskin long fin ribbon e Moscow blue long fin ribbon.

A partir de todas essas linhagens, foi selecionada uma Moscow, que apresenta variação para três cores: purple, green e blue e, além disso, constitui também uma das linhagens mais premiadas em exposições nacionais e internacionais. A referida linhagem se caracteriza por apresentar uma dimensão corpórea pronunciada, coloração vistosa e atrativa. Foram avaliados diversos tipos de tecidos de exemplares machos e fêmeas, visando a identificação dos materiais biológicos mais adequados para cada tipo de análise.

A referida criação, os reprodutores são escolhidos através de características do fenótipo de acordo com o padrão internacional da associação mundial de criadores (IFGA). Os machos devem apresentar o seguinte padrão: abertura de cauda 'padrão delta' com 70° de abertura; corpo e cauda no padrão 1:1; dorsal no padrão 4:2; a nadadeira dorsal deve ter

a mesma cor ou desenho da nadadeira caudal. Os machos são predominantes na transmissão das características hereditárias, enquanto que as fêmeas são selecionadas pela sua uniformidade de padrão, com dorsal forte e com cauda no formato redondo, pois delas saem maior percentagem de machos no padrão delta.

Todas as linhagens são mantidas conforme padrões adotados pelo criador e pesquisador Sr. Alex Sandro Victor Leite.

A unidade experimental foi constituída de 5 a 10 animais da linhagem Moscow Blue, que foram avaliados separadamente para as análises citogenéticas, sendo considerado cada animal uma repetição.

## **6.2. Descrição das condições experimentais**

A criação é mantida em estufa com controle de temperatura, realizada através de aquecedor de ambiente, sendo a temperatura ideal para espécie entre 26 e 28° C. São realizadas sifonagens dos aquários com troca parcial de água duas vezes por semana, aproximadamente 25 % do volume de água do aquário em cada troca. A espécie necessita entre 8 e 12 horas de iluminação diária. Em aquários para matrizes e reprodutores, é necessária uma quantidade mínima de 5 litros de água para cada peixe; já em aquários de alevinos, exige-se o mínimo de 1 litro de água para cada peixe.

## **6.3. Variáveis analisadas**

Para a análise citogenética foi realizada uma avaliação do nível de ploidia dos exemplares da linhagem selecionada, para verificar possíveis variações cromossômicas na mesma. O local de realização dos experimentos foi o Laboratório de Citogenômica e Bioinformática da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, localizada em Presidente Prudente (SP).

## **6.4. Análise citogenética**

No presente trabalho, objetivou-se descrever uma metodologia para o preparo de lâminas e análise cromossômica de lebetes, de modo a verificar características citogenéticas que possam evidenciar a evolução da espécie e auxiliar no estabelecimento de cruzamentos controlados entre e dentro de linhagens.

Para a análise citogenética, os machos foram utilizados e deles retirados os testes, pois é o local que contém nas células a maior frequência de metáfases, facilitando a observação dos cromossomos.

## 7. RESULTADOS

A metodologia padronizada no laboratório envolveu a análise de microsporócitos de machos adultos, os quais foram removidos por excisão do abdômen, e utilizados para o preparo de lâminas microscópicas, como descritas a seguir:

Etapas do protocolo experimental: Após a fixação do lebeste em solução de clorofórmio, e observação do mesmo sob a lupa é realizada uma incisão no abdome (região acima do gonopódio) de modo a remover os “testes” do animal em solução tampão fosfato; Os tecidos são removidos e espalhados sobre a lâmina, com o auxílio da pinça, em solução fixadora Carnoy; As células espalhadas com o fixador Carnoy são deixadas para secar ao ar livre; É realizada a coloração com a solução Giemsa a 1% por 3 minutos ao ar livre; As lâminas permanentes são montadas com o auxílio de bálsamo do Canadá.

A partir desse protocolo experimental, foram desenvolvidas outras adaptações para que obtivesse melhores resultados; A fixação do lebeste em solução de clorofórmio, e observação do mesmo sob a lupa; É realizada uma incisão no abdome (região acima do gonopódio) de modo a remover os “testes” do animal em solução tampão fosfato (PBS); Os tecidos são removidos e colocados e colocados em lâmina com enzimas proteolíticas por 5 minutos; As células espalhadas cuidadosamente com o fixador Carnoy são deixadas para secar ao ar livre; Coloração com a solução Giemsa a 1% por 3 minutos ao ar livre; Coloração com Carmim-acético a 45% aplicado enquanto as células são espalhadas ao ar livre; As lâminas permanentes são montadas com o auxílio de Bálsamo do Canadá.

Todos os tratamentos testados comprovam a viabilidade das metodologias empregadas. Preparações com alta qualidade foram conservadas na forma permanente, para posterior registro fotográfico e documentação das configurações. Foi constatado que as testes do animal lebiste (*Poecilia reticulata*) apresentam maior frequência de divisões celulares, facilitando a observação dos cromossomos. Preparações realizadas com o auxílio de enzimas proteolíticas permitiram a observação de uma elevada frequência de divisões celulares associadas a um alto índice de configurações em metáfases.



Figura 01 (a e b): Exemplares machos de lebiste da linhagem Moscow, utilizada nos experimentos de padronização da metodologia de análise citogenética.

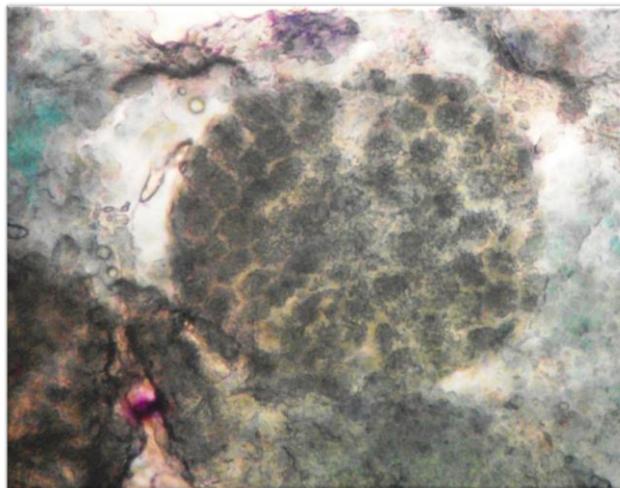


Figura 02: Estruturas teciduais das testes que apresentam grande número de células em divisão celular.

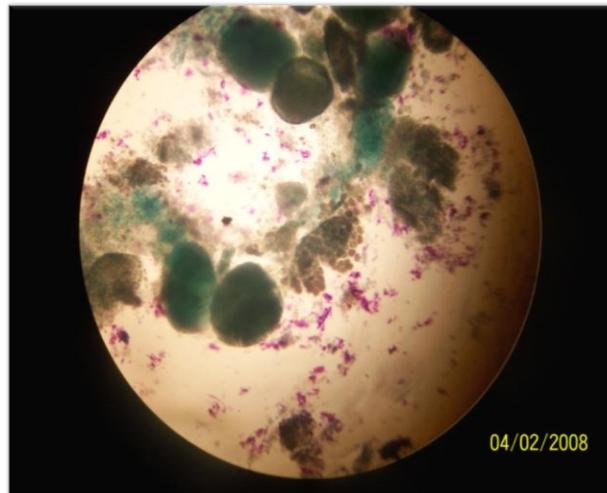


Figura 03: Digestão dos tecidos das testis com solução enzimática e maceração mecânica permitem a liberação dos cromossomos para visualização ao microscópio ótico.

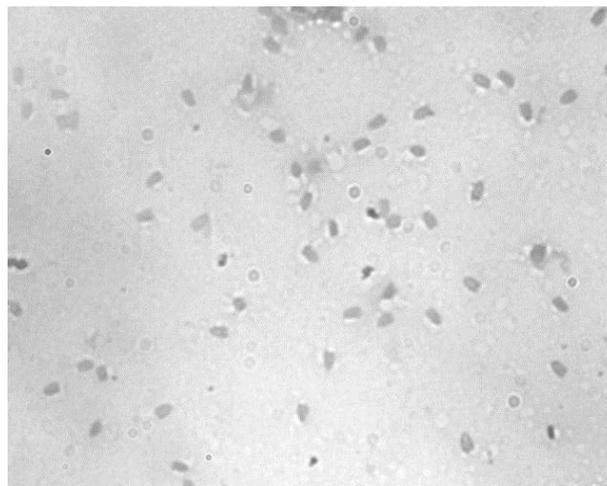


Figura 04: Cromossomos metafásicos de lebiste (*Poecilia reticulata*) mostrando a sua característica morfológica típica com predomínio de acrocêntricos.

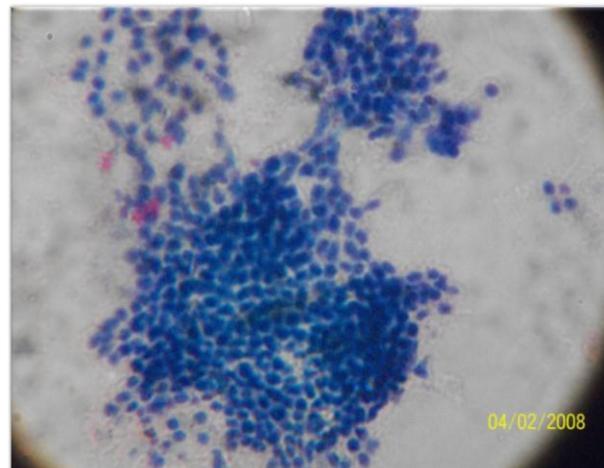


Figura 05: Cromossomos metafásicos de Lebiste (*Poecilia reticulata*) após coloração com solução de Giemsa a 1%, revelando elevado nível de ploidia.

Com o objetivo de avaliar a hipótese de possível ocorrência de poliploidia, foi padronizada uma nova metodologia de preparo citológico, envolvendo a observação dos cromossomos com um corante específico de DNA, o reagente de Schiff, em associação ao corante Carmin-acético. Após o isolamento das testes do lebiste sob solução tampão fosfato, é realizada a fixação do material em solução de Carnoy por 30 minutos; Em seguida, o material é mantido em um frasco escuro com 2 gotas do reagente de Schiff por 45 minutos, permanecendo este tempo em local protegido da luz. Ao término do tratamento, o material é lavado em água corrente, ainda dentro do frasco, durante 10 minutos. Após a coloração, os tecidos são transferidos para uma lâmina, onde são fragmentados em três partes, com o auxílio de solução de Carnoy, associado ao corante Carmin-acético. As lâminas são deixadas para secar ao ar livre e, em seguida, montadas na forma permanente com a utilização de bálsamo do Canadá. Foram fotodocumentadas as imagens representativas dos melhores resultados dos tratamentos avaliados.



Fixação:	Fixador Carnoy (ácido Acético glacial 3:1 (v/v) etanol absoluto) que é utilizado tanto para células vegetais quanto para células animais.	
Tratamento enzimático:	São utilizadas enzimas proteolíticas com o objetivo de degradar as membranas celulares expondo seu conteúdo, de forma que esse material possa ser evidenciado após a coloração.	
Corantes:	Giemsa a 1%	Corante de afinidade pelo DNA, de coloração azul/roxa. Tratamento com solução a 1% por 3 (três) minutos, e lavado com água deionizada e deixado secar ao ar livre.
	Carmin-acético a 45%	Corante que possui afinidade pelo material genético e outras estruturas celulares, sua coloração é avermelhada. O corante é adicionado durante o espalhamento dos testes em associação com o fixador Carnoy. A lâmina não é lavada, e deixada secar ao ar livre.
	Reagente de Schiff	Corante específico de DNA. São adicionadas gotas do corante sobre os testes em tratamento, dentro de um frasco escuro, e mantido por 45 minutos. Em seguida é lavado, em água corrente por 10 minutos.

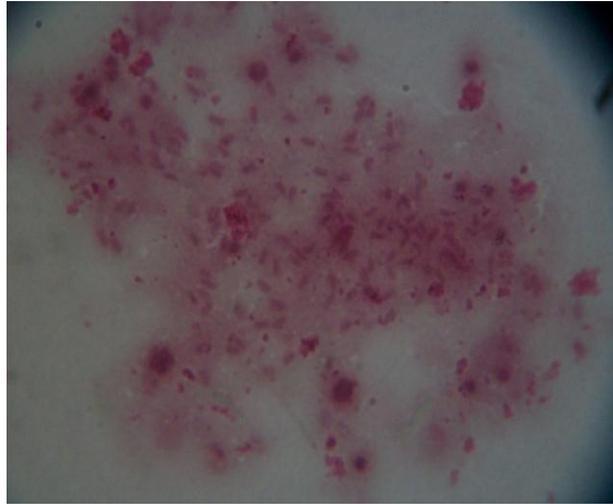


Figura 06: Cromossomos metafásicos de lebiste (*Poecilia reticulata*) sob coloração com o reagente de Schiff e solução de Carmin-acético, evidenciando a sua morfologia típica.

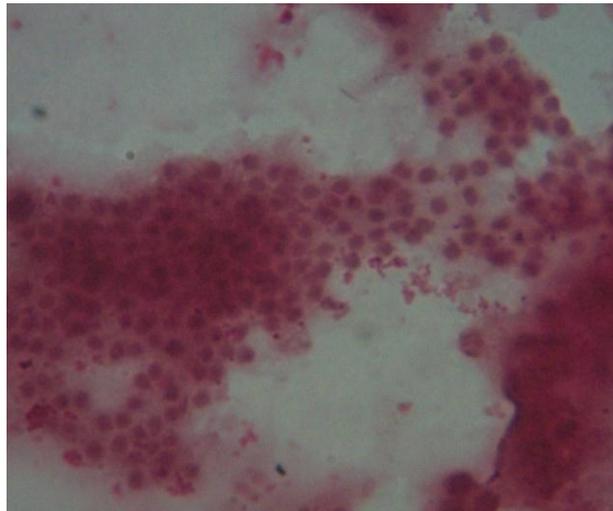


Figura 07: Metáfase mitótica de lebiste (*Poecilia reticulata*) sob coloração com o reagente de Schiff e solução de Carmin-acético, evidenciando a ocorrência de poliploidia ( $4n = 92$  cromossomos).

## 8. DISCUSSÃO

Foi identificado um tecido que apresenta alto índice mitótico e o material por excelência para estudo citogenético. Os cromossomos são evidentes com centrômero e

bandas. Foram identificados diferentes graus de condensação nos cromossomos, os quais são recomendados para diferentes propósitos. Quando os cromossomos apresentam o grau de condensação adequado, é possível observar os padrões de bandas, bem como possíveis translocações e deleções.

Já quando os cromossomos estão no grau máximo de compactação, há dificuldade na análise da morfologia das cromátides, portanto sendo possível realizar apenas a contagem dos cromossomos, caracterizando as células como diplóides ou poliplóides.

Diversas configurações demonstraram a ocorrência de diferentes níveis de ploidia em um mesmo animal, indicando que a dimensão corpórea pronunciada dos mesmos está possivelmente associada com a elevação nos seus níveis de ploidia, provavelmente em condições de mosaicismo.

A solução de Giemsa apresentou bons resultados na coloração dos cromossomos. No entanto, além de corar também os artefatos na lâmina, o corante estava corando-os intensamente o que dificultava a identificação dos tamanhos das cromátides bem como o padrão de bandas. Somente a solução de Carmin-acético estava corando além dos cromossomos, outros elementos considerados artefatos, que atrapalham e prejudicam tanto a contagem dos cromossomos como na identificação dos mesmos.

O reagente de Schiff, por se tratar de um corante específico de DNA, corou apenas os cromossomos, evitando a coloração excessiva de artefatos. No entanto, a coloração não ficou tão evidente, o que mostrou que o mesmo deve ser utilizado para a coloração dos cromossomos em associação com outros corantes.

Entre os tratamentos, a associação do corante reagente de Schiff e o Carmin-acético evidenciou os melhores resultados, uma vez que foi possível corar primeiramente os cromossomos com o reagente de Schiff e, em seguida, intensificar a coloração dos mesmos com a solução de Carmin-acético. Este tratamento permitiu a identificação dos cromossomos, a sua contagem e também a visualização de um padrão de bandas cromossômicas.

## 9. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que foi possível a padronização da metodologia de análise citogenética em lebiste, sendo que a intensificação das análises indica uma perspectiva muito promissora para o estudo genético da espécie.

Diversas configurações demonstraram a ocorrência de diferentes níveis de ploidia em um mesmo animal, indicando que a dimensão corpórea pronunciada dos mesmos está possivelmente associada com a elevação nos seus níveis de ploidia, provavelmente em condições de mosaicismos.

O alto índice mitótico abre perspectivas muito favoráveis para a sua utilização futura com outras técnicas de coloração, tais como: coloração de fluorescência, bandamento de alta resolução, construção de cariótipo e assim, a análise comparativa de diferentes linhagens.

## REFERÊNCIAS

- Brooks R., Endler J.A. Direct and indirect sexual selection and quantitative genetics of male traits in guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*. 2001; 55: 1002-1015.
- Confederação dos criadores de guppy. Disponível em: <http://www.ccg.org.br/>. Acesso em 22 de setembro de 2010.
- Endler J. A. Multiple-trait coevolution and environmental gradients in guppies. *Trends Ecol. Evol.* 1995; 10: 22-29
- Foo C.L., Dinesh K. R., Lim T. M., Chan W. K., Phang V. P. Inheritance of RAPD markers in the guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Zool. Sci.* 1995; 12: 535-541
- Haskins C.P. Haskins E. F., McLaughlin J.J.A., Vertebrate speciation. University of Texas Press; Austin, TX: 1961. Polymorphism and populations structure in lebistes reticulates, an ecological study.
- Haskins C. P., Young P., Hewitt R. E., Haskins E. F. Stabilized heterozygosity of supergenes mediating certain Y-linkage colour patterns in populations of lebistes reticulates. *Heredity*. 1070; 25: 5575-589
- Houde A. E., Endler J. A. Correlated evolution of female mating preferences and male color pattern in the guppy *Poecilia reticulata*. *Science*. 1990; 248: 1405-1408

Hughes K. A., Rodd F.H., Reznick D. N. Genetic and environmental effects on secondary sex traits in guppies (*Poecilia reticulata*). J. Evol. Biol. 2005; 18: 35-45.

Koo L., Lim T. M., Chan W.K., Phang. V.P.E. Genetic basis of the variegated tail pattern in the guppy, *Poecilia reticulata*. Zoo.Sci. 1999a; 16: 431-437

Koo L., Lim T.M., Chan W. K. Phang. V.P.E. Linkage analysis and mapping of tree sex-linked color pattern genes in the guppy, *Poecilia reticulata*. Zoo. Sci. 1999b; 16: 893-903.

Koo L., Lim. T.M., Chan W. K., Phang. V.P.E. Sex-linkage of the black caudal-peduncle and red tail genes in the tuxedo strain of the guppy, *Poecilia reticulata*. Zoo. Sci. 1999c; 16:629-638.

Koo L., Lim M. H., Suresh H., Gan D.K., Lim K.F., Chen F., Chan W.K., Lim T. M., Phang V.P. Genetic linkage maps of the guppy (*Poecilia reticulata*): assignment of RAPD markers to multipoint linkage groups. Mar. Biotechnol. 2003; 5: 279-293.

Lander E.S., Botstein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics. 1989; 121:185-199.

Leder E.H., Danamann R.G., Ferguson M.M. The candidate gene, clock, localizes to a strong spawning time quantitative trait locus region in rainbow trout. J. Hered. 2006; 97:74-80.

Lindholm A.K., Breden F., Alexander H.J., Chan W.K., Thakurta S.G., Brooks R. Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. Mol. Ecol. 2005; 14: 3671- 3682.

Nanda, I., Feichtinger, W., Schmid, M., Schroder, J.H., Zischler, H e Epplen, J.T. (1990). Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. J. Mol. Evol.30:456-462.

Nanda, I., Scharl, M., Feichtinger, W., Epplen, J.T., Schmid M. (1992). Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. Chromosoma 101:301-310.

Prehn, L.M., Rasch, E.M. (1969). Cytogenetic studies of *Poecilia* (Pisces). I. C chromosome numbers of naturally occurring poeciliid species and their hybrids from eastern Mexico. Canad. J. Genet. and Cytol. 11:880-895.

Radionova, M.I., Nikitin S.V. Borodin P.M. Synaptonemal complex analysis of interspecific hybrids of *Poecilia* (Teleostei, Poeciliidae). 1996.

Reznick D.N., Endler J.A, The impact of predation on life history evolution in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). Evolution, 1982; 36: 160-177.

Shen X., et al. Construction of genetic linkage maps of guppy (*Poecilia reticulata*) based on AFLP and microsatellite DNA markers. Aquaculture.2007, 271:178-187.

Tripathi N., Hoffman M., Willing E.M., Lanz C., Weigel D., Dreyer C. Genetic linkage map of the guppy, *Poecilia reticulata*, and quantitative trait loci analysis of male size and colour variation. 2008.



Watanabe T., Yoshida. M., Nakashima M., Taniguchi N. Linkage mapping of AFPL and microsatellite DNA markers with the body color and sex-determining loci in the guppy (*Poecilia reticulata*). Zool. Sci. 2005; 22: 883-889.

Winge O. One-side masculine and sex-linked inheritance in *lebistes reticulata*. J. Genet. 1922a; 12: 145-162.

Winge O. A peculiar mode of inheritance and its cytological explanation. J.Genet. 1922; 12: 137-144.

Winge O. The location of eighteen genes in *Lebistes reticulates*. J. Genet. 1927: 18: 1-43.

Winge O, Ditlevsen E. Colour inheritance and sex determination in *Lebistes*. Heredity. 1947; 1: 65-83.

Yosida, H.T., Hayashi M. (1970). Preliminary note on karyotype of guppy and topminnow. Annu. Rep. Nat. Inst. Genet. 21:52.