

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO USO DE MARCADORES MOLECULARES NA
PRODUÇÃO E COMÉRCIO DE HÍBRIDOS EM PISCICULTURAS
BRASILEIRAS**

LILIAN CRISTINA MILANI

MESTRADO

**Botucatu, SP
2021**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO USO DE MARCADORES MOLECULARES NA
PRODUÇÃO E COMÉRCIO DE HÍBRIDOS EM PISCICULTURAS
BRASILEIRAS**

Lilian Cristina Milani

Orientador: Fabio Porto-Foresti

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Botucatu, SP
2021**

M637a	Milani, Lilian Cristina AVALIAÇÃO DO USO DE MARCADORES MOLECULARES NA PRODUÇÃO E COMÉRCIO DE HÍBRIDOS EM PSICULTURAS BRASILEIRAS / Lilian Cristina Milani. -- Botucatu, 2020 66 p. : tabs., mapas Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Fabio Porto-Foresti 1. Marcadores Moleculares. 2. Híbridos. 3. Psiculturas. 4. Microssatélites. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Dedico meu agradecimento às instituições e pessoas que contribuíram na concretização desse trabalho, em especial:

A Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, campus Bauru e ao Departamento de Ciências Biológicas, pelas condições, suporte e formação oferecidas na realização não só desse trabalho, mas também para minha formação pessoal e profissional.

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu pela oportunidade.

Ao Professor Fábio Porto-Foresti, meu mito obrigado por todos os ensinamentos ao longo de todo esse caminho e por me confiar essa oportunidade tão importante.

A amiga Fernanda Dotti do Prado pela paciência, por todos os ensinamentos desde o início dessa caminhada e por me fazer crescer como profissional.

As amigas Carolina e Yasmin, por toda ajuda, amizade e companheirismo durante essa etapa, por dividirem os dias difíceis, as risadas, o trabalho e as conquistas.

Aos amigos que o LAGENPE me deu, que ainda estão presentes e que já deram o próximo passo em suas carreiras. Vocês foram muito importantes no meu crescimento. Agradeço o carinho, as experiências e o companheirismo.

Ao Lucas, meu parceiro, companheiro. Obrigada por todo o carinho, por apoiar essa etapa tão importante, por fazer parte da minha vida, por incentivar cada passo.

Aos meus pais Rosalina e Denilson e minha irmã Sophia. Palavras não são suficientes para expressar meu amor incondicional, minha devoção e gratidão à vocês, por todo incentivo, pelo apoio, suporte, oportunidade. Minhas conquistas sempre terão parte de vocês, obrigada por tudo!

RESUMO

Durante anos a aquicultura vem se destacando por se caracterizar como uma atividade de crescimento rápido no que diz respeito a produção de alimentos e geração de empregos, mostrando-se como o setor de maior produção as pisciculturas do Brasil, somando 54,1 milhões de toneladas. De um modo geral, o potencial de crescimento desse setor é significativo no mundo todo. Entretanto, só o Brasil produziu em 2018 cerca de 722.560 mil toneladas de peixes, expondo um número 4,5% maior do que os resultados obtidos no ano anterior. Uma prática que se tornou muito comum na grande maioria das pisciculturas de todo país é a produção de híbridos interespecíficos ou intergênero, resultantes do cruzamento de espécies diferentes, visando sempre a produção de linhagens diferenciadas e com maior valor comercial. Este estudo buscou monitorar a utilização de híbridos em pisciculturas que comercializavam peixes parentais e híbridos e que receberam manejo e orientação correta para comercializar esses produtos, em um intervalo de 10 anos e consequentemente, avaliou-se também qual a pratica atual adotada para essas pisciculturas. Foram utilizados marcadores genéticos previamente descritos para identificar lotes de peixes puros e híbridos dos grupos dos Serrassalmídeos (peixes redondos) como *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) e *Colossoma macropomum* (Tambaqui) e bagres Pimelodídeos, *Pseudoplatystoma corruscans* (Pintado), *Pseudoplatystoma reticulatum* (Cachara) e *Leiarius marmoratus* (Jandiá), que correspondem às espécies de peixes nativos mais utilizadas em hibridação. Os resultados desse estudo mostraram que pelo menos 10% das amostras da primeira piscicultura e 23,8% da segunda piscicultura estudada não foram comercializados de forma adequada, apontando incongruências entre a mercadoria combinada e o que verdadeiramente foi comercializado, mostrando que apesar da orientação recebida 10 anos atrás, essas pisciculturas não alteraram a pratica na produção e comercialização trocada de produtos.

ABSTRACT

For years aquaculture has stood out for being characterized as a fast-growing activity with regard to food production and job creation, showing itself as the sector of greatest production as fish farms in Brazil, totaling 54.1 million tons . In general, the growth potential of this sector is significant worldwide. However, Brazil alone produced around 722.560 thousand tons of fish in 2018, exposing a number 4.5% higher than the results obtained in the previous year. A practice that has become very common in the vast majority of fish farms across the country is the production of interspecific or intergeneric hybrids, combined by crossing different categories, alignments always producing differentiated lines and with greater commercial value. This study sought to monitor the use of hybrids in fish farms that marketed parental and hybrid fish and that received correct management and guidance to commercialize these products, over a 10-year interval and, consequently, it was also evaluated what is the current practice adopted for these fish farms. Previous genetic markers were used to identify lots of pure and hybrid fish from the groups of Serrassalmids (round fish) such as *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) and *Colossoma macropomum* (Tambaqui) and Pimelodidae catfish, *Pseudoplatystoma corruscans* (Pintado), *Leiarius marmoratus* (Jandiá), which corresponds to the species of native fish most used in hybridization. The results of the study induced that at least 10% of people. Of the first fish farm and 23.8% of the second fish farm studied, they were not marketed properly, due to the inconsistencies between the combined merchandise and what was made available, showing that despite the guidance they received 10 years ago, these fish farms did not change the practice in exchanged production and marketing of products.

SUMÁRIO

1.	
INTRODUÇÃO	8
1.1 Hibridação de peixes	9
1.2 Híbridos de Serrasalmidæ	10
1.3 Híbridos de Pimelodidæ	11
1.4 Riscos da hibridação	12
1.5 Marcadores moleculares	15
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Material	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Extração de DNA	24
3.2.2 Aplicação dos marcadores moleculares	25
4. RESULTADOS	30
4.1 Piscicultura A.	31
4.1.1 “Pintado Real”	32
4.1.2 “Tambacu”	32
4.2 Piscicultura B.	33
4.2.1 “Pintado Real”	34
4.2.2 “Tambacu”	35
5. DISCUSSÃO	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	52

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ao longo de anos a aquicultura vem se destacando pela atividade de rápido crescimento na linha de produção de alimentos saudáveis e geração de empregos no mundo todo (Siqueira, 2018). Dentro da aquicultura, o ramo em que mais se produziu foi o dos peixes, gerando 54,1 milhões de toneladas e, embora o setor aquícola tenha registrado uma queda no período de 2001 a 2016, ainda assim é o que mais cresce quando comparado a outros grandes setores de produção de alimentos (FAO, 2018). De acordo com o relatório sobre o estado da Pesca e Aquicultura a nível mundial (SOFIA, 2018) até 2030 estima-se que a aquicultura supere a pesca que corresponde a 54% do pescado para consumo e contribua com 60% do montante final.

De modo geral, o potencial de crescimento da aquicultura no mundo todo é extremamente significativo, já que a atividade pode também ser praticada nos oceanos, além de representar altas expectativas na possibilidade de maior produção de alimentos em escala mundial com qualidade e condições sustentáveis para as próximas décadas (Siqueira, 2017)

Segundo dados da EMBRAPA (2017), durante o período de 2005 a 2015 a atividade das pisciculturas brasileiras cresceu 123%, chamando atenção para um setor que no país era caracterizado por empreendimentos de pequeno porte e pouco investimento, além do baixo nível tecnológico utilizado na época. De acordo com o anuário da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR, 2019), o Brasil produziu em 2018 cerca de 722.560 mil toneladas de peixes, um número 4,5% maior do que o contabilizado no ano de 2017. Atualmente, o Brasil ocupa a posição de 13º colocado quando levado em consideração a produção total de peixes e a 8ª posição no ranking mundial quanto a produção de peixes de água

doce (SOFIA, 2020), mostrando o grande desenvolvimento das pisciculturas no Brasil e salientando um potencial de expansão ainda maior, já que esse é um ramo que continua se mostrando promissor ao longo dos próximos anos.

1.1 Hibridação em peixes

A diversidade genética é um dos fatores essenciais para alavancar o potencial de sobrevivência e o sucesso reprodutivo das espécies em contrapartida às mudanças ambientais, sendo um fator transmitido através das gerações e representando a base da evolução das mais diversas espécies (Frankram et al., 2008; Laikre et al., 1999). Por esse motivo, é necessário conservar o potencial evolutivo, representado pela variabilidade genética e estruturação populacional que ocorre em populações naturais, evidenciado em diversos estudos (Frankham et al., 2008; Habel e Schmidt, 2012; Allendorf, 2017; Habel e Schmidt, 2018; Lowe et al., 2017).

A hibridação consiste no cruzamento de indivíduos geneticamente diferentes de uma espécie (diferentes linhagens), entre espécies diferentes (hibridação interespecífica) e até mesmo entre espécies de diferentes gêneros, técnica usada para produzir organismos com características desejáveis, com melhoria geral de desempenho na aquicultura (EMBRAPA, 2014). Os programas de hibridação utilizam diversas espécies com o objetivo de produzir indivíduos que possuam melhor desempenho que as espécies parentais, envolvendo requisitos como resistência à doenças e variações ambientais, alta taxa de crescimento e carne de qualidade. (Hashimoto et al., 2014).

A produção de peixes híbridos no Brasil tem envolvido várias espécies Neotropicais, especialmente peixes redondos da família Serrassalmidae e

bagres da família Pimelodidae, gerando produtos com viabilidade e valor comercial de grande interesse dos produtores (Porto-Foresti et al., 2010), com relevante aceitação no mercado consumidor e protagonismo no atual panorama de desenvolvimento da piscicultura no país (Hashimoto et al., 2012).

1.2 Híbridos de Serrasalminidae

A ampla família Serrasalminidae que inclui 16 gêneros e 92 espécies tem distribuição Neotropical e engloba os peixes conhecidos popularmente como Pacus e Tambaquis, considerados importantes economicamente e na alimentação na América do Sul (Lopes et al., 2019). No panorama da aquicultura atual, essas espécies tem grande destaque devido sua produção e comercialização em larga escala, principalmente de seus híbridos a fim de supriras altas demandas (Hashimoto et al., 2014).

Os cruzamentos interespecíficos das espécies *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) macho e *Colossoma macropomum* (Tambaqui) fêmea, produzem híbridos comercializados como “Tambacu”, possuindo hábito alimentar onívoro, rusticidade e resistência a baixas temperaturas do Pacu, além da precocidade do Tambaqui, se adequa a vários níveis de produção popularizados no Brasil pela sua resistência e robustez, características que alavancaram sua produção e comércio ao longos dos últimos dez anos (Pedroza et al., 2016). O híbrido Tambacu é muito apreciado pelos consumidores e considerada uma espécie nobre devido as suas características como textura, sabor e a baixa quantidade de gordura quando comparado aos seus parentais, além de resistir bastante a mudanças climáticas e apresentar desempenho satisfatório se comparado a outros peixes redondos existentes (Fortunato et al., 2017). Entretanto, a família

Serrasalminae ainda se destaca na produção de outros híbridos a partir de uma terceira espécie, *Piaractus brachipomus* conhecida popularmente como “Pirapitinga”. Seu cruzamento com as espécies *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* geram híbridos conhecidos como “Patinga” e “Tambatinga” respectivamente, que também possui grande valor no mercado produtor (Martins, 2017).

1.3 Híbridos de Pimelodidae

Adentrando a família Pimelodidae, considerada um dos grupos mais importantes dentre os Siluriformes Neotropicais, destacam-se as espécies *P. corruscans* (cachara), *P. reticulatum* (pintado) e *L. marmoratus* (Jandia), notáveis por seu grande porte (Hashimoto et al., 2015), de alta importância comercial, produzidas massivamente e utilizadas em programas de hibridação em pisciculturas (Queiroz, 2020). A produção de peixes nesse grupo vem crescendo devido à grande demanda de mercado e a necessidade de diminuir os impactos das populações naturais exacerbados pela pesca comercial (Sabaini et al., 2018). Muito visados na produção aquícola por atributos como qualidade da carne e porte avantajado, a prática de hibridação dessas espécies também tem contribuído para alavancar ainda mais a produção dentro das pisciculturas brasileiras, gerando híbridos popularmente conhecidos como “Ponto-e-vírgula” (cruzamento de fêmea *P. corruscans* e macho *P. reticulatum*) e “Cachapinta” (cruzamento de fêmea *P. reticulatum* e macho *P. corruscans*), detentores de melhor desempenho em desenvolvimento do que seus progenitores (Prado et al., 2017a).

Existe uma carência de informações a respeito da produção desses híbridos e uma dificuldade de produção de algumas matrizes como o pintado por exemplo, fazendo com que diversos produtores tenham se aventurado em cruzamentos entre diferentes gêneros dentro dos Siluriformes (Albuquerque et al., 2014), gerando indivíduos menos carnívoros, com boa aceitação e diferentes tipos de alimentação, como os exemplares de “Cachandiá” ou “Pintado da Amazônia” que são provenientes de cruzamentos de fêmeas de *P. reticulatum* em machos de *L. marmoratus* (Sabaini et al., 2018). Essas características nesses híbridos, são provenientes da espécie *L. marmoratus* que embora em seu habitat natural tenham hábitos alimentares piscívoros, desenvolveram comportamento onívoro, facilitando a transição e aceitação a uma diversidade de alimentos e até mesmo em sua criação no confinamento, sendo essas particularidades uma justificativa para a inserção dessa espécie no ramo da piscicultura (Coelho, 2017). Outro “experimento” tem sido o híbrido conhecido como “Pintado Real”, que em teoria é produto híbrido do cruzamento entre *P. reticulatum* e *P. corruscans* que posteriormente é cruzado com *L. marmoratus*. Porém, até o momento pouco se sabe sobre a viabilidade desses híbridos nas pisciculturas ou a respeito de sua produção, entretanto, seu comércio vem ganhando espaço rapidamente.

1.4 Riscos da hibridação

A hibridação e introgressão genética entre diferentes espécies (hibridação interespecífica), também está entre as principais ameaças para a conservação de muitas espécies de plantas e animais (Allendorf et al., 2001; 2010; Steyer et al., 2018). Híbridos interespecíficos gerados através da reprodução induzida

entre diferentes espécies em cultivo podem entrar em contato com a natureza através de introduções e escapes, contaminando geneticamente as populações nativas (Allendorf et al., 2001; 2010; Hashimoto et al., 2014; Prado et al., 2017).

Os híbridos interespecíficos ocorrem por intermédio humano na maioria das vezes decorrente de interesses principalmente comerciais sobre esses indivíduos diferenciados e que não ocorrem na natureza, exceto casos específicos e raros. A prática dos cruzamentos tem crescido ao longo dos últimos anos exponencialmente, visando a produção de diversas linhagens que venham a ter características diferenciadas e por esse motivo, maior valor comercial (Porto-Foresti, et al., 2011), sendo um problema relevante o risco de contaminação dos estoques parentais, prejudicando sua integridade e consequentemente o desempenho dos indivíduos produzidos (Albuquerque et al., 2014).

No Brasil, embora estejamos vendo uma crescente de estudos ecológicos e genéticos relacionados aos híbridos, ainda são escassos os resultados relacionados diretamente a cadeia produtiva dos peixes, principalmente de híbridos possivelmente férteis como por exemplo o “Tambacu” e “Cachapinta” citados anteriormente, que podem retrocruzar com espécies parentais e gerar linhagens híbridas avançadas (Hashimoto et al., 2012).

Além disso, estudos anteriores já constataram a produção em larga escala e comercialização de híbridos sem monitoramento algum, o que pode ocasionar que consumidores acabem adquirindo exemplares híbridos sem conhecimento (Hashimoto et al., 2014; Porto-Foresti et al., 2013), além do acontecimento de possíveis escapes recorrentes de indivíduos híbridos das pisciculturas para a natureza, um problema atual mostrado por exemplo por Prado et al. (2017) e

Yabu et al. (2018), que relatam em seus estudos a ocorrência de prováveis contaminações na Bacia do Paraná e Paraguai, rio Tibagi e seu afluentes por híbridos e linhagens híbridas F1 oriundas de pisciculturas.

Uma outra questão importante é a classificação dos indivíduos híbridos produzidos. De acordo com documento da EMBRAPA (2014), existe uma vasta dificuldade de sistematizar a nomenclatura dos híbridos produzidos no mundo todo, sendo que apenas quatro espécies de híbridos de água doce são reconhecidas e a demais classificadas como “não identificadas como espécie válidas”. Mesmo não sendo reconhecidos, ainda sim os híbridos representam uma parcela elevada da produção mundial de peixes (FAO, 2014).

A identificação desses indivíduos por sua vez se torna ainda mais difícil devido a existência de características por vezes muito semelhantes às características apresentadas pelos parentais, principalmente quando ainda são juvenis, tornando a identificação morfológica desses peixes uma tarefa árdua (Hashimoto et al., 2012). Essas questões de identificação dificultam muito os trabalhos de manejo, podendo fazer com que comerciantes coloquem a venda algo diferente do que oferecem.

Dos anos 80 em diante, a aplicação de métodos e ferramentas genéticas passou a ser mais efetiva com relação a contribuição nos programas de criação de peixes (Foresti, 2000; Hashimoto et al., 2012), fazendo com que nesse cenário onde a hibridação interespecífica uma das técnicas mais utilizadas nas pisciculturas do mundo todo, incluindo o Brasil, os marcadores moleculares ganhem destaque auxiliando em minimizar essa situação e sendo uma ferramenta eficiente na elucidação dos problemas já mensurados.

1.5 Marcadores moleculares

Os avanços dos estudos genéticos e a entrada da era da genética molecular possibilitou levar os estudos a um nível superior com diferentes métodos de análises que se aplicam a diferentes formas de estudo da biodiversidade aplicadas a qualquer âmbito, seja manejo ou conservação (Zhang et al., 2013) e o desenvolvimento de marcadores moleculares para a detecção de polimorfismos de DNA é um avanço muito significativo no campo da genéticamolecular (Turcheto et al., 2017).

Marcadores moleculares monomórficos com qualidades diagnósticas entre espécies (Single Nucleotide Polymorphism — SNP, íntrons e diversas regiões gênicas) são ferramentas que permitem identificar com tamanha precisão por meio de mutações espécies e seus híbridos. (Hashimoto et al., 2014). Além da visualização direta das mutações através de sequenciamentos, também existe a possibilidade de utilizar técnicas que permitam acessar estas mutações indiretamente por visualização de bandas diagnósticas em eletroforese, como a técnica de PCR (polymerase chain reaction), podendo ser PCR-multiplex que consiste em utilizar *primers* espécie-específicos para um determinado *locus*, o qual difere de uma a poucas substituições nucleotídicas para as espécies a serem analisadas, de tal forma que testes podem ser multiplexados, isto é, duas ou mais reações de PCR podem ser aplicados simultaneamente no mesmo tubo (Henegariu et al. 1997; Markoulatos et al. 2002).

Essa técnica tem se mostrado importante na diferenciação e identificação de espécies, o que também a torna promissora na identificação de híbridos, principalmente por sua rapidez e eficiência (Gonçalves et al., 2019). Além da

técnica PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), onde os produtos de PCR podem ser digeridos com enzimas de restrição e visualizados por simples eletroforese devido à grande quantidade de DNA produzida pela PCR (Hashimoto et al., 2011; Prado et al., 2011), além de representar uma considerável redução do tempo de execução, custo e complexidade (Hashim et al., 2019).

Por outro lado, marcadores polimórficos com variação intraespecífica, como os microsátélites (SSR - Simple Sequence Repeat), além de seu potencial para detectar diversidade genética e estruturação populacional (Andersen et al., 2014; Mulder et al., 2017; Prado et al., 2017a) também têm sido aplicados em estudos de hibridação (Dubut et al., 2010; Bohling et al., 2013; Khosravi et al., 2013; Zhang et al., 2013; Grobler et al., 2018; Parveen et al., 2018; Steyer et al., 2018), destacando-se por ser uma alternativa efetiva no processo de caracterização de genomas complexos (Giustina et al., 2020).

A distinção das espécies pode ser realizada através da comparação de suas frequências e tamanhos alélicos, onde a acumulação de mutações pode contribuir mais substancialmente para a diferenciação interespecífica do que ao observado entre as populações das espécies (Roques et al., 1999), sendo possível observar padrões de hereditariedade em híbridos e cruzamentos F1 a partir de um gel de agarose (Solarte-Murillo et al., 2020).

Os microssátélites são regiões abundantes de DNA com sequências muito curtas (de 2 a 6 pares de base) que se repetem em tandem, conhecidos também por SSR ou Simple Sequence Repeats (TAUTZ, 1989). São marcadores neutros e podem ser facilmente genotipados através de PCR, por isso tem sido amplamente desenvolvido para diferentes espécies a fim de acessar diversidade

genética e estruturamento populacional. Requerem a construção de bibliotecas genômicas e o desenho de iniciadores no caso de marcadores inéditos, porém também pode-se utilizar iniciadores desenvolvidos previamente para espécies geneticamente relacionadas (Penha et al., 2020).

Por fim, cada marcador molecular tem suas indicações, exigências, vantagens e desvantagens, de acordo com o problema biológico a ser estudado (Liu e Cordes 2004), como por exemplo os marcadores mitocondriais que são úteis para o conhecimento do parental materno de um organismo ou os marcadores nucleares, que nos permitem inferir até mesmo linhagens híbridas avançadas. O uso destes marcadores moleculares em conjunto pode proporcionar informações complementares, enriquecendo a análise e respondendo às questões de forma mais precisa (Porto-Foresti et al., 2010; 2013; Prado et al., 2014). Esses marcadores tem sido utilizado com sucesso em diversas espécies, mostrando-se extremamente úteis para a manutenção das mesmas em projetos aplicados ao manejo, conservação e monitoramento de variabilidade genética (Souza et al., 2012)

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Considerando a produção de híbridos interespecíficos nas pisciculturas de todo o país e a importância de estudos genéticos sobre essa prática, o trabalho tem como objetivo avaliar e monitorar geneticamente o comércio e produção de híbridos:

- 1)** Identificar geneticamente amostras de híbridos de diferentes pisciculturas afim de identificar as espécies e híbridos a que correspondem as amostras.
- 2)** Avaliar e monitorar exemplares de pisciculturas orientadas geneticamente 10 anos atrás, na produção e comércio de híbridos fim de verificar se os híbridos são manejados corretamente dentro das pisciculturas e se existem possíveis misturas ou contaminações genéticas que são provenientes de introgressões entre estoques parentais e híbridos.
- 3)** Com base em dados genéticos, dar subsídios para propor aos órgãos competentes a criação de um selo de autenticidade, certificando as pisciculturas e criadores de peixes que estão produzindo e manejando híbridos, o que permitirá como medida mitigadora, um controle adequado sobre o uso destes animais de forma a minimizar os impactos negativos aludidos com a implantação de projetos de hibridação interespecífica em pisciculturas;
- 4)** Indicar a eficiência do uso das análises genética na identificação e organização das espécies puras e dos produtos híbridos produzidos nas pisciculturas brasileiras, com fins comerciais e de pesquisa básica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foi realizada a compra dos alevinos em duas pisciculturas particulares diferentes dentro do país, as quais já haviam sido alvos de estudos passados (Hashimoto et al., 2012) e conscientizadas a respeito da forma de manejo adequada para o tipo de trabalho que esses estabelecimento prestam. Os indivíduos variaram entre 2 a 15cm. Visando manter a integridade das pisciculturas, os nomes e informações comerciais não foram divulgados. Desse modo, apenas o monitoramento da produção e do comércio dos indivíduos foi analisado, excluindo assim uma análise forense.

Foram comprados na piscicultura A (MG) e piscicultura B (MS) (tabela 1 e figura 1) juvenis híbridos reconhecidos como “Pintado Real” (figura 2) e “Tambacu” (figura 3).

Tabela 1. Amostragem de juvenis coletados

	Pintado Real	Tambacu
Piscicultura A (MG)	30	50
Piscicultura B (MS)	100	250
Total	430 Juvenis	

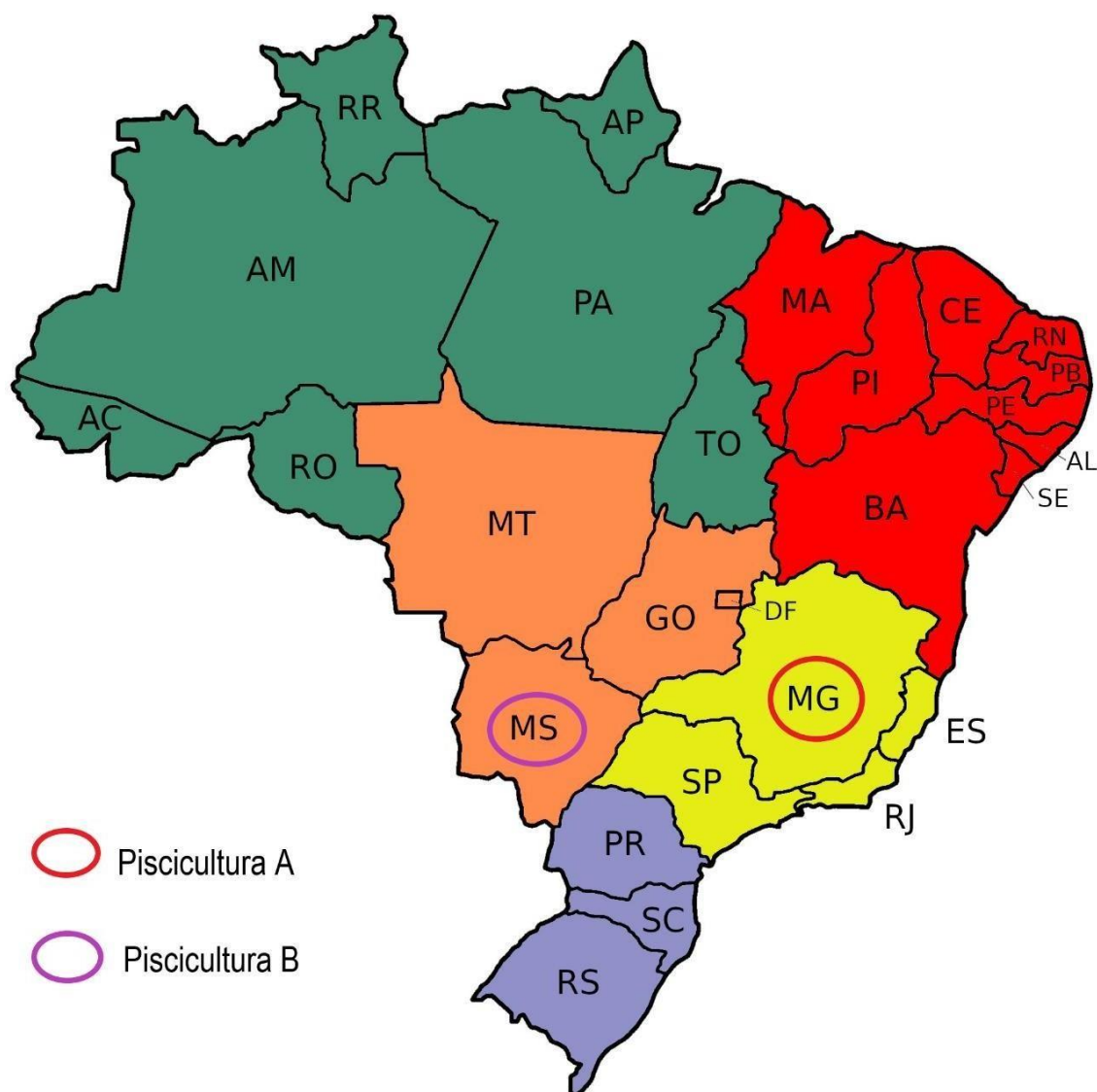


Figura 1. Localização das pisciculturas A e B.



Figura 2. Exemplar de Pintado Real.
FONTE: Revista Globo Rural.

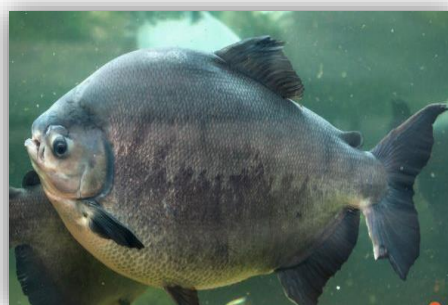


Figura 3. Exemplar de Tambacu.
FONTE: www.cpt.com.br

3.2 Métodos

Para as análises moleculares foram utilizados os métodos de extração e purificação de DNA dos exemplares, obtidos a partir de material sólido como nadadeira e, posteriormente, aplicou-se os marcadores moleculares para identificação dos parentais e seus respectivos híbridos.

3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi baseada no protocolo do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas modificações.

Protocolo extração de DNA consiste em retirar um pequeno pedaço de tecido, adicionar aos tubos de microcentrífuga e levar à estufa por aproximados 10 minutos; Adicionar 300µl de Nuclei lysis Solution ao tecido; Adicionar 6µl de Proteinase k e utilizar o vórtex; Levar a solução ao banho-maria a 60°C por aproximadamente 2 horas; Retirar do banho-maria e esperar até que as amostras estejam em temperatura ambiente; Adicionar 2,5µl de RNase e levar ao banho a 37°C por 30 minutos; Retirar do banho-maria e esperar até que as amostras estejam em temperatura ambiente; Adicionar 200µl de Protein Precipitation Solution e misturar; Levar ao freezer a -80°C por 10 minutos; Centrifugar por 4 minutos a 13.000rpm; Transferir o sobrenadante para a segunda série de tubos de microcentrífuga contendo 600µl de Isopropanol e misturar por inversão; Centrifugar por 4 minutos a 13.000rpm e descartar o sobrenadante; Adicionar 600µl de etanol 70% e centrifugar por 4 minutos a 13.000rpm; Descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente

overnight e por fim, adicionar 30µl de DNA Rehydration Solution por 12 horas em temperatura ambiente.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado gel red e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta. As amostras de DNA obtidas estão sendo mantidas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos e de moléculas, para posterior processamento das análises genético-moleculares.

3.2.2 Aplicação dos marcadores moleculares

Após a extração de DNA, foi iniciado o processo de testagem dos marcadores moleculares, os quais foram utilizados por Hashimoto et al, 2011. As reações de PCR (reação da polimerase em cadeia) foram realizadas com primers específicos, sendo eles os genes nucleares RAG II (*recombination activating gene II*), Globina, mitocondrial 16S e loci microssatélites Prt3, Prt6, Prt12 e Prt30 para os pintados reais e os genes nucleares APOC (*apolipoprotein C-I like*), AZIN (*antizyme inhibitor*), ZPI, TROP (*α-tropomyosin*) e mitocondrial CYTB (*cytochrome – b*) para os Tambacus (Tabelas 2 e 5). As reações inicialmente foram realizadas a uma concentração de aproximadamente 150 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5mM, tampão da Taq 1X, 0.5 unidades de Taq polymerase (Invitrogen), 0.1 a 0,4 µM de cada primer e 10-50 ng de DNA genômico (total de 25 µl). As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) (tabelas 3 e 6).

Tabela 2. Primers utilizados da amplificação dos marcadores em Tambacu.

Marcador genético	Primer	Sequência do primer	Referência
Apoc	Apoc Pm F	5'- AGAAGCTGGAAGAGAGCGAGC -3'	Mourão <i>in prep</i>
	Apoc Pb R	5'- TTTAACTTACTCATCTGCTCATTGAT - 3'	
	Apoc Cm R	5'- TCGGACAGATCCTTTCCCAA -3'	
	Apoc Serra F	5'- CGCTGATGCTCGTGCTTCTT -3'	
	Apoc Serra R	5'- AATGAGGCGTAGCAATATCACA -3'	
Azim	Azin Pm R	5'- TGGCCTCCTCTGTCTGAGCTA -3'	Mourão <i>in prep.</i>
	Azin Pb R	5'- TTTCCATAAGGTGCCTGCAGT -3'	
	Azin Cm R	5'- CATATCAAATACACAACGGGCG -3'	
	Azin Serra F	5'- CCCTGAGAACATCATCTTGTCG -3'	
Tropomiosina	Trop Pm R	5'- CTCAGCTGGATCTCCTGA -3'	Hashimoto et al. (2011)
	Trop Pb R	5'- TTGACTTTATGCCACACAAAT -3'	
	Trop Cm R	5'- ATACAACAATGCCATCGCT -3'	
	Trop Serra F	5'- GAGTTGGATCGGGCTCAG -3'	
ZPI	ZPI Pm R	5'- CATTCAGATACACAACGGGCG -3'	Mourão <i>in prep.</i>
	ZPI Pb R	5'- TTTCCATAAGGTGCCTGCAGT -3'	
	ZPI Serra F	5'- CGCTGATGCTCGTGCTTCTT -3'	
CYTB	CYTB Serra F	5'- GATATCTCYACAGCCTTCTCCTC -3'	Hashimoto et al., 2011
	CYTB Serra R	5'- GCGTAGGCAAATAGGAAGTATC -3'	

Tabela 3. Condições utilizadas para obtenção dos amplicons. Min: minutos, s: segundos.

Gene		Desnaturação	Ciclos	Extensão	Referência
		95°C		72°C	
Nuclear	APOC	5 min	35x 95°C/30s, 61°C/30s, 72°C/30s	7 min	Mourão <i>inprep</i>
	AZIN	5 min	35x 95°C/30s, 61°C/30s, 72°C/30s	7 min	Mourão <i>inprep</i>
	TROP	5 min	35x 95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/10s	7 min	Hashimoto et al. 2011
	ZPI	5 min	35x95°C/30s, 61°C/30s,72°C/30s	7 min	Mourão <i>in prep</i>
Mitocondria I	CYTB	5 min	30x 95°C/30s, 60°C/45s, 72°C/30s	7 min	Hashimoto et al., 2011

Tabela 4. Bandas diagnósticas por marcador, por espécie.

Método/Marcado	Tamanho do fragmento (Pb)		
	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Referência
PCR-Multiplex /TROP	269	172	Hashimoto et al., 2011
PCR-Multiplex/APOC	400	280	Mourão <i>in prep.</i>
PCR-Multiplex/AZIN	290	500	Mourão <i>in prep</i>
PCR - Multiplex/ZPI	250	310	Mourão <i>in prep</i>
PCR-RFLP /CYTB	152 e 513	261 e 405	Hashimoto et al., 2011

Tabela 5. Marcadores moleculares para a identificação dos bragres Pintados Reais.

Primer	Sequência	Referência
RAG2 Silu F	CCTGAGTGCTACCTATTCATGG	Prado et al., 2011a
RAG2 Silu R	A CTTGGGAGGAGAGACCATC	
Glob Silu F	TCAATATGGTTCATGGACAGA	Porto-Foresti et al., 2013
Glob Silu R	CCAGAAGCTGAAAGTAGACAGT	
16S F	ACGCCGTTTATCAAAAACAT	Palumbi, 1996
16S R	CCGGTCTGAACTCAGATCCGT	
Prt 3 F	AGTGGCGTTAGGTCTGTGTG	Prado et al., 2014
Prt3 R	CTCTGCCATCAATACGCTCA	
Prt 6 F	CAGATTGCTGATGTGCTGTG	Prado et al., 2014
Prt 6 R	CTGCGTGATAACTTGCCAGA	
Prt 12 F	AGAGCCATGCTGTTGTTGTG	Prado et al., 2014
Prt 12 R	GTTTGTGGGACTCGGTGACT	
Prt 30 F	CACCTGAGACACCACACGTT	Prado et al., 2014
Prt 30 R	CGGAGGTAGGAGAGAAAGAG AG	

Tabela 6. Condições utilizadas para a obtenção de amplicons. Min = minutos; S= segundos.

Gene		Desnaturação 95°C	Ciclos	Extensão o 72°C	Referência
	RAG	5 min	35x 95°C/30s, 58°C/30s, 72°C/8s	7 min	Prado et al., 2011a
Nuclear	GLOBIN A	5 min	35x 95°C/30s, 59°C/30s, 72°C/20s	7 min	Prado et al., 2014
	Prt 3	5 min	35x 94°C/30s, 58°C/30s, 72°C/10s	30 min	Prado et al., 2014
	Prt 6	5 min	35x94°C/30s, 58°C/30s,72°C /30s	30 min	Prado et al., 2014

	Prt12		35x94°C/30s, 58°C/30s,72°C /30s	30 min	Prado et al., 2014
	Prt30		35x94°C/30s, 58°C/30s,72°C /30s	30 min	Prado et al., 2014
	Mitochondrial	16S	5 min	30x 95°C/30s, 58°C/45s, 72°C/8s	7 min Palumbi, 1996

Tabela7. Bandas diagnósticas por marcador e espécie.

Método/Marcado rMolecular	Tamanho do fragmento (Pb)			Referência
	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	<i>Leiarius marmoratus</i>	
PCR-Multiplex /RAG	308	277	521	Prado et al., 2014
PCR- Multiplex/GLOBIN A	137	569	--	Prado et al., 2014
PCR-Multiplex/16S	650	388	612	Prado et al., 2014
PCR - Multiplex/Prt3	159	185-197	236	Prado et al., 2014
PCR-Multiplex/Prt6	210-228	254-272	280	Prado et al., 2014
PCR- Multiplex/Prt12	296-310	272-282	230	Prado et al., 2014
PCR- Multiplex/Prt30	69-91	105-133	280	Prado et al., 2014

Os resultados de amplificação e testagem dos primers foram analisados em gel de agarose corado com Gel Red, utilizando o DNA *ladder* de 100 Pb (Sinapse) de acordo com os dados prévios apresentados nas tabelas 4 e 7. Os produtos resultantes da PCR foram aplicados em gel de agarose 2%, corado com gel red e

visualizado em transluminador ultravioleta (Figura 4). Após visualização foi realizada a comparação dos pares de bases obtidos com os dados de referência (tabelas 4 e 7).

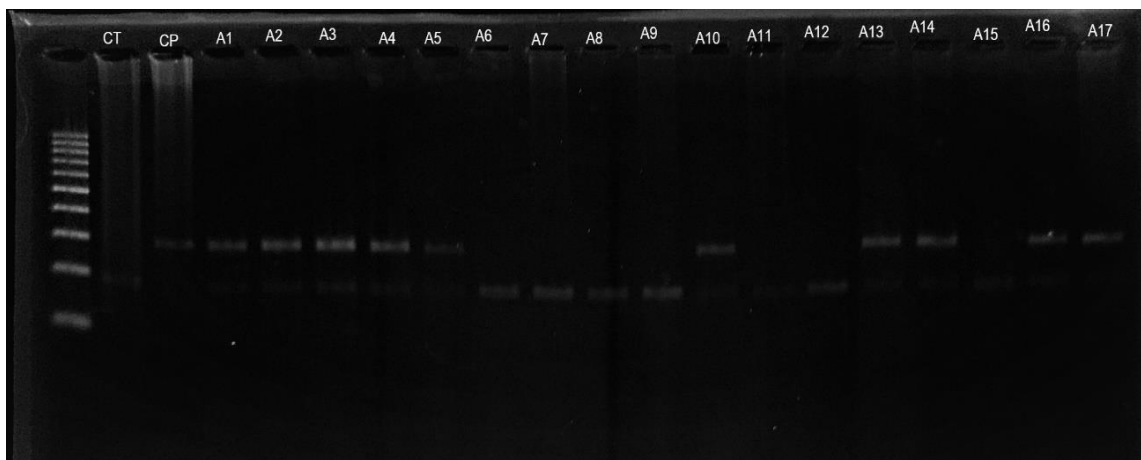


Figura 4. Gel de agarose 2% para visualização das amostras. CT= Controle Tambaqui; CP= Controle Pacu; A n° = Amostra

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Foram analisados no total 322 indivíduos provenientes de duas pisciculturas relatadas anteriormente.

4.1 Piscicultura A

Foram analisados ao todo 126 indivíduos, 30 conhecidos popularmente como “Pintado Real” e 96 conhecidos como “Tambacus”.

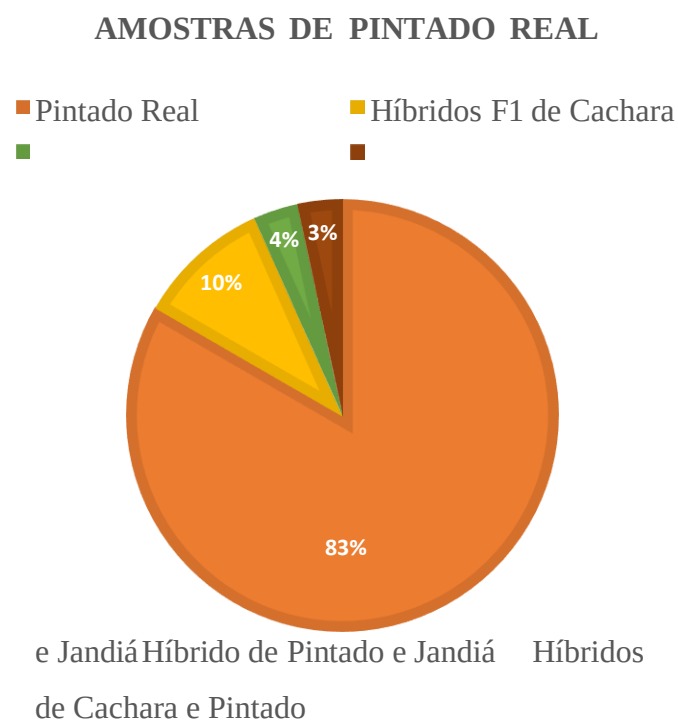
4.1.1 “*Pintado Real*”

Foram testados sete marcadores moleculares, sendo seis marcadores nucleares e um marcador mitocondrial,

A partir do marcador mitocondrial utilizado (16S), pôde-se observar que o parental materno de todos os exemplares testados (salvo uma única exceção) é a “Cachara” (*P. corruscans*). Analisando os marcadores nucleares, pôde-se observar que a maioria dos indivíduos são provenientes de um provável cruzamento do híbrido “Cachapinta” (Cachara x Pintado) com Jandiá, condição observada através da presença de bandas das 3 espécies quando considerados todos os marcadores nucleares, indicando a mistura genética de 3 espécies. Para três indivíduos testados com marcadores nucleares, as bandas heterozigotas apresentavam traços apenas de Cachara e Jandiá, indicando prováveis linhagens híbridas F1. Um dos indivíduos apresentou somente bandas de pintado e Jandiá e um último exemplar testado apresentou padrões mistos de Pintado e Cachara.

Sendo assim, obtivemos desse lote de Pintados Reais: 25 indivíduos que provaram ser produto do cruzamento entre Pintado e Cachara, que posteriormente foram cruzados com Jandiá. Também obtivemos 3 indivíduos provenientes do cruzamento apenas entre Cachara e Jandiá, 1 indivíduo resultante do cruzamento de Pintado com Jandiá e por fim, 1 indivíduo vindo do cruzamento de uma Cachara com um Pintado. Esses resultados podem ser observados no gráfico 1.

Gráfico 1. Resultado das análises de Pintado Real da Piscicultura A



4.1.2 “Tambacu”

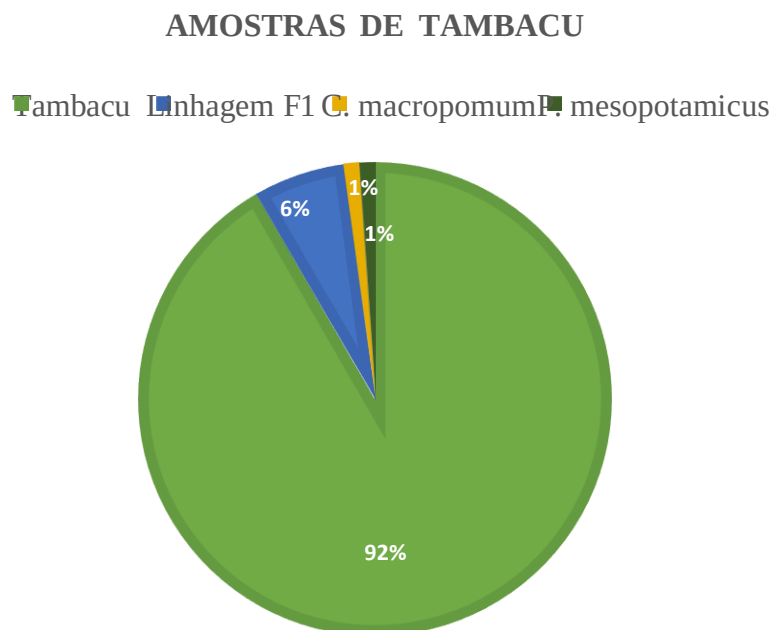
Foram utilizados 5 marcadores moleculares para os testes, sendo 4 marcadores nucleares e um marcador mitocondrial.

A partir do marcador mitocondrial (CYTB) pôde-se observar que, para a maioria dos indivíduos (95), o parental materno dos exemplares analisados foi a

espécie *C. macropomum*, enquanto que em apenas 1 indivíduo o parental materno é a espécie *P. mesopotamicus*.

As análises apontaram que do total de 96 Tambacus, 88 apresentaram duas marcações de bandas diferentes e dentro dos padrões esperados para cada marcador nuclear testado, mostrando serem realmente híbridos provenientes do cruzamento das espécies de *Colossoma macropomum* (tambaqui) e *Piaractus mesopotâmicus* (pacu), enquanto 6 indivíduos mostraram-se possíveis híbridos F1 entre essas espécies, 1 indivíduo apresentou bandas apenas para *P. mesopotamicus* e um último indivíduo apresentou marcações somente para *C. macropomum* (gráfico 2).

Gráfico 2. Resultado das análises de Tambacu da Piscicultura A



4.2 Piscicultura B

Foram analisados ao todo 196 exemplares: dos quais, 100 são classificados como “Pintados Reais” e 96 como “Tambacus”.

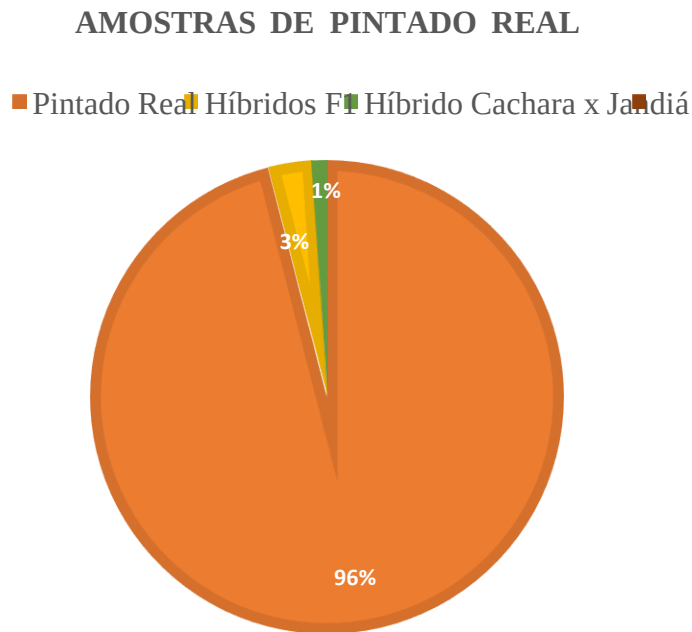
4.2.1 “*Pintado Real*”

Assim como na piscicultura A, para esses indivíduos também foram utilizados 7 marcadores moleculares, dentre eles 6 marcadores nucleares e 1 marcador mitocondrial.

O marcador mitocondrial utilizados (16S) sinalizou que todos os indivíduos tem como parental materno a espécie *P. corruscans* (Cachara). Quanto aos marcadores nucleares, a maioria das amostras (96 indivíduos) apresentaram as bandas com o número de pares de bases adequados para três espécies em questão. Houve também bandamentos que deram indícios de 3 indivíduos de linhagens F1 provenientes do cruzamento apenas de Cachara e Jandiá e 1 indivíduo mostrou-se um híbrido “Cachandiá” (cruzamento entre Cachara e Jandiá).

Dessa forma, observamos que as análises trataram de 96 híbridos conhecidos no mercado como Pintado Real, 3 possíveis híbridos de linhagem F1 entre Cachara e Jandiá e por fim um único indivíduo híbrido entre Cachara e Jandiá diretamente (gráfico 3).

Gráfico 3. Resultado das análises de Pintado Real da Piscicultura A



4.2.2 “Tambacu”

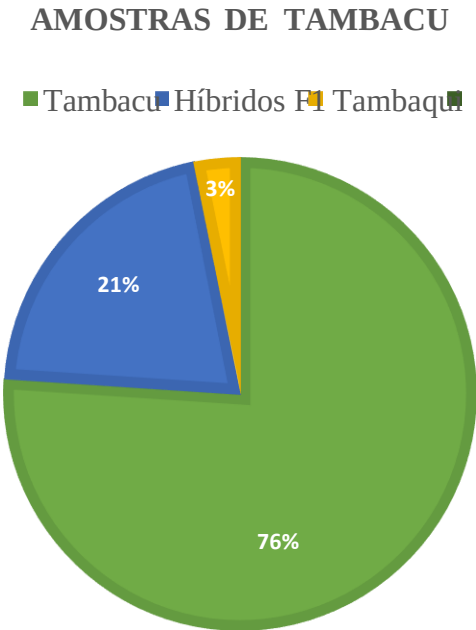
Para os testes foram mantidos o mesmo padrão de marcadores moleculares da piscicultura anterior, sendo testados 5 marcadores. Dentre eles 4 marcadores nucleares e um marcador mitocondrial.

O marcador mitocondrial (CYTB) evidenciou que o parental materno predominante nas análises era a espécie *C. macropomum*, já que este foi o parental materno apontado no resultado para todos os indivíduos testados.

Já os marcadores nucleares, evidenciaram que a maioria dos exemplares apresentaram as bandas em tamanhos adequados para as duas espécies que são cruzadas para a obtenção desse híbrido. Entretanto, um número relevante de indivíduos obtiveram bandamentos que indicam alta probabilidade de serem uma linhagem híbrida F₁. Por fim foram encontrados também indivíduos puros. Em resumo: as análises comprovaram a presença de 73 indivíduos híbridos entre as espécies *P. mesopotamicus* e *C. macropomum*, 20 indivíduos de

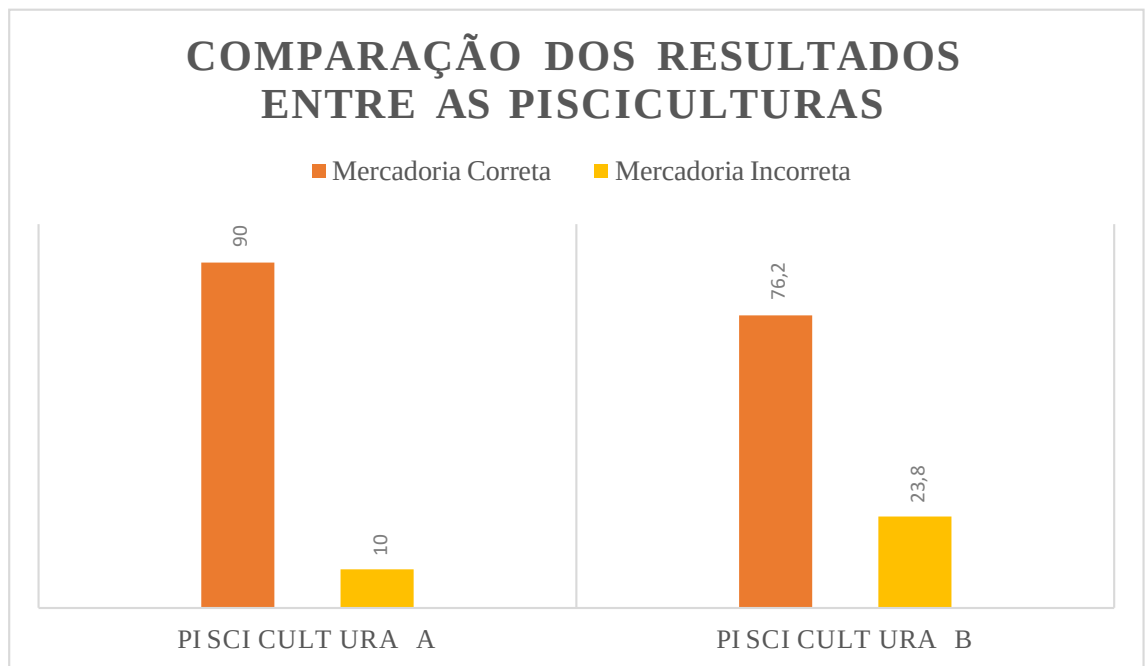
linhagem F1 e por fim 3 indivíduos de Tambaqui, totalizando assim 96exemplares analisados (gráfico 4).

Gráfico 4. Resultado das análises de Tambacu da Piscicultura B



Quando observamos o panorama geral apresentado por esses resultados, é notável que uma parte significativa de ambos os lotes de mercadoria obtidos das duas pisciculturas estudadas se mostraram incorretos (gráfico 5). Os resultados específicos de ambas as pisciculturas para cada marcador utilizado podem ser visualizados nos apêndices deste trabalho.

Gráfico 5. Comparação dos resultados em porcentagem obtidos através dos marcadores moleculares entre as pisciculturas



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O Brasil tem conquistado ano após ano seu espaço na aquicultura mundial (Ferreira e Barcellos, 2018), chegando a ser protagonista na produção de peixes de cativeiro. Diante desse panorama, é adequado que estudemos cada vez mais as formas de produção das diversas espécies em cativeiro no país, para obter metodologias que possam ser valiosas ao manejo e fiscalização e de uma produção sustentável e consciente em nosso Brasil.

Os marcadores utilizados permitiram eficácia na identificação dos híbridos estudados e linhagens híbridas F1 constatadas. O estudo analisou duas pisciculturas de diferentes estados que já haviam sido orientadas quanto ao manejo adequado na criação desses peixes, nas quais foram comprados diferentes híbridos. Após a aplicação dos marcadores moleculares, foram constatadas inconsistências entre o que foi pedido na compra e o que foi recebido. Na piscicultura A localizada em MG, foram analisados 30 exemplares adquiridos como Pintado Real, porém 16% do produto recebido estava sendo comercializado de maneira incorreta, correspondendo a híbridos diferentes do pedido, mas que possuem morfologia quase idêntica ao verdadeiro Pintado Real, assim como na piscicultura B que apresentou 4% da mercadoria de pintados reais incorreta. Embora em margem menor na piscicultura B, é possível relatar que as duas pisciculturas não estão realizando o monitoramento adequado em relação a esses indivíduos, fazendo dessa forma o comércio inadequado e ilegal desses peixes. A grande mistura de espécies que ocorre na formação dos híbridos é um dos maiores fatores atuantes sobre os resultados dessa análise,

visto que em diversos casos pode-se usar 3 espécies para a produção dos indivíduos, como por exemplo o Pintado Real.

Os híbridos conhecidos como Tambacus, após análises com os marcadores moleculares apresentaram também contradições. Embora que em menor número se comparado aos pintados reais, 8% dos exemplares recebidos da piscicultura A se tratavam de híbridos de linhagem F1 ou até mesmo exemplares de espécies puras (no caso o Tambaqui). Já na piscicultura B, os resultados das análises apontaram para um comércio inadequado de 23,9% dos Tambacus.

É notável o fato de que quando comparados os dados obtidos por Hashimoto (2012) aos apresentados até o momento nesse trabalho podemos observar que há aproximadamente dez anos atrás a piscicultura A já apresentava o comércio inadequado dos peixes e apesar da orientação prestada nada foi feito para que essa prática fosse alterada. Já a piscicultura B não havia apresentado mercadoria inadequada relacionada aos tambaquis no último estudo, enquanto no presente, apresentou o maior índice de incompatibilidade entre produto na nota e produto obtido dentro desse estudo, revelando uma falta de controle e monitoramento dos estoques nos últimos anos.

Se levarmos em consideração todos os exemplares analisados da piscicultura A, podemos chegar ao consenso de que 10% do que foi comprado no estabelecimento não estava de acordo com a nomenclatura comercial utilizada na venda, enquanto a piscicultura B apresentou índices maiores de 13,8%.

Estudos anteriores já haviam apontado como tem sido imprecisa a produção e o comércio de peixes e seus híbridos (Hashimoto et. al., 2012; 2014),

sendo essa uma ocorrência frequente e com implicações problemáticas desde o começo do manejo, sendo importante frisar que a identificação e o monitoramento não são simples, uma vez que as diferenças morfológicas entre híbridos e parentais tem diferenças muito sutis. Essa sutileza e a falta de ferramentas de identificação, podem causar problemas desde as etapas iniciais de produção até a venda do produto final e a falta do manejo adequado pode resultar na geração de retrocruzamentos ou intercruzamentos híbridos, uma prática que pode levar à diluição ou até mesmo perda de características desejáveis, viabilidade da prole e até mesmo aumento da mortalidade.

Diante da realidade de falhas encontradas é importante ressaltar que em nosso país, diversos estabelecimentos que realizam o cultivo de peixes não são licenciados/regulamentados, problema esse que muitas vezes também está relacionado com o comércio ilegal de espécies, muito difundido até mesmo nas redes sociais segundo um estudo da UFBP em 2020, o que dificulta ainda mais uma fiscalização eficiente. Além da significativa falta de padronização de nomenclatura comercial relacionada ao pescado interno brasileiro, que acaba por exacerbar o comércio trocado de espécies e híbridos produzidos (Carvalho et al., 2011; Martins, 2017).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do conhecimento das diversas batalhas que cercam a cadeia produtiva de peixes no Brasil há muitos anos, vários autores já sugeriram que existe a necessidade de adoção de práticas que possam monitorar e regular o problema encontrado por meio de ferramentas que possibilitem a identificação eficaz dos produtos cultivados e posteriormente comercializados (Porto-Foresti et. al., 2010; Hashimoto et. al., 2012; 2014).

O estudo mostrou até o momento que as pisciculturas com práticas inadequadas a respeito da genética de seus indivíduos há dez anos ainda continuam a realizar o manejo incorreto e a venda imprudente de mercadorias, mostrando que esse ramo que tanto tem crescido no Brasil vem realizando suas atividades sem muito monitoramento.

Isso indica que ainda é recorrente a necessidade de metodologias ativas de monitoramento genético principalmente como a abordada nesse estudo, com marcadores de baixo custo que permitirão quando atreladas aos órgão competentes, a construção de um plano de manejo correto desses animais minimizando os impactos da implantação de técnicas de hibridação.

Os marcadores utilizados contribuem elucidando as subestimações, evitando a produtividade pela introgressão genética e a venda trocada de produtos (Porto-Foresti et. al., 2010), além de poder ser usado nas diversas etapas da cadeia produtiva, abrangendo desde o manejo e estoque de matrizes até a venda final dos juvenis (Hashimoto et. al., 2014). Sendo então a ferramenta principal do monitoramento que vem sendo deixado de lado nas pisciculturas brasileiras, mas que desempenha um papel fundamental na produção e desenvolvimento da aquicultura.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque DM, Ribeiro RP, Rodriguez-Rodriguez MDP (2019). Avanços no programa de melhoramento genético do Cachara no Brasil. *Ciência Animal*, v.29, n.1, p.109-120.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evolut.*, 16(11):613-622.
- Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nature*, 11(10):697–709.
- Allendorf FW (2017). Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Molecular ecology*, 26(2), 420-430.
- Bohling JH, Adams J R, Waits LP (2013) Evaluating the ability of Bayesian clustering methods to detect hybridization and introgression using an empirical red wolf data set. *Mol. Ecol.*, 22(1):74–86.
- Coelho, GCZ (2017). Análise ontogenética comparativa pós eclosão das progênes provenientes da reprodução de *Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann & Eigenmann, 1889, *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) e do híbrido resultante do cruzamento entre estas espécies.
- Dubut V, Sinama M, Martin JF, Megléc E, Fernandez J, Chappaz R, Gilles A (2010) Crossspecies amplification of 41 microsatellites in European cyprinids: A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. *BMC Res. Notes*, 3:135-143.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, (2014). Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1008360/1/cnpasadoc3.pdf>> acesso em 03/02/2020.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, (2017). Disponível em
<[https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-
/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos)> acesso
em 25/05/2019.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA 2020) - Meeting the
sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA
3.0 IGO.

FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA 2020) - Meeting the
sustainable development goals. ISBN: 978-92-5-130562-1.

Ferreira D, & Barcellos L.JG (2018). Enfoque combinado entre as boas práticas de
manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. *Boletim do Instituto de
Pesca*, 34(4), 601-611.

Foresti F, 2000. Biotechnology and fish culture. *Hydrobiologia*, 420: 45-47. Fortunato,
N, Machado, TGM, Borges, JLA, Braga, LC, de Paiva, SM, Lopes,
PRS (2017). Influência de densidades de tambacu juvenis no sistema de bioflocos
sobre o GMD e CAA. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*,
9(2).

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação.
Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 262 pp. Frankham R, Ballou
JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University
Press, UK, 607 pp, 2002.

Giustina LD, Rossi AAB, Vieira FS, Tardin FD, Neves LG, Pereira TNS
(2017) Florest. vol.27 no.4 <https://doi.org/10.5902/1980509829894> .

Gonçalves, EPM, Barros, MCS, Pessôa, MC, Cardilli, DJ, Roos, TB, & Moraes, CM
(2019). Padronização de uma PCR para a autenticação do *Salmo salar*

- em pratos da culinária japonesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2), 640-646. Epub June 06, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10280>
- Grobler P, van Wyk AM, Dalton D. L., van Vuuren BJ, Kotzé A (2018). Assessing introgressive hybridization between blue wildebeest (*Connochaetes taurinus*) and black wildebeest (*Connochaetes gnou*) from South Africa. *Conservation Genetics*, 1-13.
- Habel JC, Schmitt T (2012). The burden of genetic diversity. *Biological Conservation*, 147(1), 270-274.
- Habel JC, Schmitt T (2018). Vanishing of the common species: Empty habitats and the role of genetic diversity. *Biological Conservation*, 218, 211-216.
- Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F (2012) Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture*, 321(1- 2): 49–53.
- Hashimoto, D. T., Prado, F.D., Senhorini, J.A., Foresti,Ff., Porto-Foresti, F. (2014) Aquaculture of Neotropical Catfish Hybrids: Genetic Strategies for Conservation and Management. In: *Carp and Catfish: biology, behavior, and conservation strategies*, Regan B (ed), New York: Nova Science Publishers, p1-30.
- Hashim, H., Al-Shuhaib, M. Exploring the Potential and Limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP Detection: A Review. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2019; 6(4): 137-144. doi: 10.29252/JABR.06.04.02.

- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH e Vogt PH (1997) Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques* 23: 504-511.
- Khosravi R, Rezaei HR, Kaboli M (2013) Detecting hybridization between Iranian wild wolf (*Canis lupus pallipes*) and free-ranging domestic dog (*Canis familiaris*) by analysis of microsatellite markers. *Zool. Sci.*, 30(1):27–34.
- Laikre L, Antunes A, Alexandrino P (1999) Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. In: Laikre L et al (eds) “Troutconcert”: EU Fair CT97–3882. Stockholm University, Sweden.
- Liu ZJ e Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Lopes PRD, Oliveira-Silva JT (2019) Nota sobre a alimentação da pirambeba *Serrasalmus brandti* (Lütken, 1875) (Actinopterygii: Serrasalminae) no estado da Bahia, região Nordeste do Brasil. *Revista Mosaicum* - Ano 15, v. 29, n. 1 - Jan./Jun.
- Lowe WH, Kovach RP, Allendorf FW (2017). Population genetics and demography unite ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 32(2),141-152.
- Markoulatos P, Siafakas N e Moncany M (2002) Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *J. Clinical Lab. Analysis* 16: 47–51.
- Martins DG (2017). Genética aplicado no estudo da cadeia produtiva de Serrasalminídeos: identificação de espécies e híbridos comercializados.
- Mulder KP, walde AD, Boarman WI, Woodman AP, Latch EK, Fleischer RC. (2017) No paternal genetic integration in desert tortoises (*Gopherus agassizii*)

following translocation into an existing population. *Biological Conservation*, 210, 318-324.

Parveen S, Abbas K, Afzal M, Hussain M (2018). Prediction of Potential Hybridization Between Three Major Carps in Ravi River (Punjab, Pakistan) Basin by Using Microsatellite Markers. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), 27- 35

Peixe Br. Anuário Brasileiro da Piscicultura, 2019.

Pedrosa MX, Rodrigues APO, Rezende FP (2016) Dinâmica da produção de tambaqui e demais peixes redondos no Brasil. *Ativos Aquicultura* Ano 2 Ed. 7. Penha

DS, Souza FP, Lima Ed Christian Suzuki de, Urrea-Rojas Am, Pandolfi VCF, Yamachita AL (2020) Transferability of heterologous primers in *Brycon falcatus*.

Acta Amaz. 50 (3): 232-238. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201904191>.

Prado FD, Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2011) Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquacult. Res.* 42.1890-1894.

Prado FD, Pardo BG, Guerra-varela J, Senhorini JA, Martínez P, Foresti F, Porto-Foresti F. (2014) Development and characterization of 16 microsatellites for the Neotropical catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* and cross species analysis. *Conservation Genetics Resources*, 6(3): 679–681.

Prado FD, Fernandez-Cebrián R, Foresti F, Oliveira C, Martínez P, Porto-Foresti F (2017a). Genetic structure and evidence of anthropogenic effects on wild populations of two Neotropical catfishes: baselines for conservation. *Journal of Fish Biology*. doi: 10.1111/jfb.13486.

Porto-Foresti, F et al. A hibridação interespecífica em peixes. Panorama da Aquicultura, v. 126, p. 28-33, 2011. Disponível em:

<<http://hdl.handle.net/11449/134753>>.

Porto-Foresti, F. et al. Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. Journal of Applied Ichthyology, v. 29, n. 3, p. 643-647, 2013. Disponível em:

<<http://hdl.handle.net/11449/75549>>.

Queiroz, DFD (2020). Descrição macroscópica e microscópica de gônadas de híbridos de siluriformes de importância comercial. Disponível em:

<<https://repositorio.ufgd.edu.br/jspui/bitstream/prefix/4460/1/DelaineFerreiradeQueiroz.pdf>> Acesso em 12/08/2021.

Sabaini, DS; Casagrande, LP; Barros, AF. Economic feasibility of the cultivation of Amazon spotted catfish (*Pseudoplatystoma spp.*) in cages, in Rondônia State, Brazil. Boletim do Instituto de Pesca, [S.l.], v. 41, n. 4, p. 825-835, nov. 2018. ISSN 1678-2305.

Siqueira, TV., Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. Ipea, Boletim regional, urbano e ambiental. Jul.-Dez., 2017.

Siqueira, TV., Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. R. BNDES, Rio de Janeiro, v. 25, n. 49, p. 119-170, jun. 2018.

Solarte-Murillo, L.V., Sandoval-Herrera, I.D., Marín-Colorado, J.A. et al. An economic method for the identification of catfish hybrids using microsatellites:

a case study of *Pseudoplatystoma metaense* × *Leiarius marmoratus* hybrids. *Conservation Genet Resour* **12**, 701–707 (2020).

<https://doi.org/10.1007/s12686-020-01166-4>.

Souza CA; Hashimoto DT; Pereira LHG; Oliveira C; Foresti F; Porto-Foresti F. Development and characterization of microsatellite loci in *Phractocephalus hemioliopterus* (Siluriformes: Pimelodidae) and their cross-species amplification in six related species. *Conservation Genet Resour* (2012) 4:499– 501 DOI 10.1007/s12686-011-9584-3.

Steyer K, Tiesmeyer A, Muñoz-Fuentes V, Nowak C (2018). Low rates of hybridization between European wildcats and domestic cats in a human- dominated landscape. *Ecology and evolution*, 8(4), 2290-2304.

Tautz, D. Hipervariability of simple sequences as a general source for polymorphic

DNA markers. *Nucleic Acid Research*, v. 17, p. 6463-6471, 1989. Universidade

Federal da Paraíba. Disponível em

<[https://www.ufpb.br/ufpb/contents/noticias/estudo-da-ufpb-revela-comercio-](https://www.ufpb.br/ufpb/contents/noticias/estudo-da-ufpb-revela-comercio-ilegal-de-peixes-ornamentais-no-facebook)

[ilegal-de-peixes-ornamentais-no-facebook](https://www.ufpb.br/ufpb/contents/noticias/estudo-da-ufpb-revela-comercio-ilegal-de-peixes-ornamentais-no-facebook)> Acesso em 01/03/2020.

Yabu, M. H. S., Vidotto-Magnoni, A. P., Casimiro, A. C. R., Garcia, D. A. Z., Costa, A. D. A., Prado, F. D. D., & Orsi, M. L. (2018). First record of non-native hybrid catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus* in the Upper Paraná River basin, Brazil. *Journal of fish biology*, 92(1), 261-267.

APÊNDICES

Tabela 1. Resultados das amostras de Tambacu da piscicultura A

Identificação da amostra	APOC		AZIN		TROPO		ZP I		CYTB		Identificação genética
	Pm	Cm	Pm	Cm	Pm	Cm	Pm	Cm	Pm	Cm	
12995	x	x	x	x	-	x	x	x	-	x	Tambacu
12996	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
12997	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
12998	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
12999	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13000	x	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13054	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13055	-	-	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13056	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13057	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13058	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13059	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13060	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13061	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13062	-	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13063	x	x	x	-	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13064	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13065	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13066	x	x	x	x	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13067	-	-	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13068	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13069	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13070	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13071	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu

13072	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13073	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13074	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13075	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13076	°	°	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13077	°	°	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13078	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13079	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13080	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13081	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13082	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13083	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13084	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13085	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13086	-	x	x	-	°	°	-	x	-	x	Híbrido F1
13087	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13088	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13089	x	x	x	-	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13090	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13091	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13092	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13093	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13094	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13095	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13096	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13097	-	x	x	-	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13098	x	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu

13099	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13100	x	-	-	x	-	x	°	°	-	x	Híbrido F1
13104	-	x	-	x	-	x	x	-	-	x	Híbrido F1
13105	-	x	-	x	-	x	-	x	-	x	<i>C. macropomum</i>
13106	x	-	-	x	-	x	°	°	-	x	Híbrido F1
13107	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13108	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13109	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13110	x	x	x	x	-	x	x	-	-	-	Tambacu
13111	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13112	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13113	°	°	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13114	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13115	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13116	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13117	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13118	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13119	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13120	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13121	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13122	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13123	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13124	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13125	x	-	x	x	x	-	x	-	-	x	Tambacu
13126	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	Tambacu
13127	x	-	x	-	x	-	x	-	x	-	<i>P. mesopotamicus</i>
13128	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu

13129	-	x	-	x	-	x	-	-	-	x	Tambacu
13130	-	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13131	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13132	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13133	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13134	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13135	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13136	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13137	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13138	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13139	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	Tambacu
13140	°	°	x	-	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13141	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13142	x	-	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13143	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13144	x	-	x	-	x	x	x	-	-	x	Híbrido F1
13145	x	-	-	x	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1

P.m– *P. mesopotamicus* (Pacu); **C.m**– *C. macropomum* (Tambaqui); ° = Sem resultados no marcador; x = Presença de banda diagnóstica; - = Ausência de banda diagnóstica.

Tabela 2. Resultado das análises de Tambacu da piscicultura B

Identificação da amostra	APOC		AZIN		TROPO		ZP I		CYTB		Identificação Genética
	Pm	Cm	Pm	Cm	Pm	Cm	Pm	Cm	Pm	Cm	
13201		x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13202	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13203	-	x	x	x	-	-	x	-	-	x	Tambacu
13204	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13205	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13206	-	x	x	x	x	-	x	-	-	x	Tambacu
13207	-	x	x	x	x	-	-	-	-	x	Tambacu
13208	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13209	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13210	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13211	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13212	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13213	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13214	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13215	x	x	-	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13216	x	x	-	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13217	x	x	-	x	-	x	-	-	-	x	Híbrido F1
13218	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13219	x	x	-	x	x	-	x	-	-	x	Tambacu
13220	-	x	-	x	-	x	-	-	-	x	<i>C. macropomum</i>
13221	-	x	-	x	°	°	x	-	-	x	Híbrido F1
13222	-	x	-	x	x	-	-	-	-	x	Híbrido F1
13223	x	x	-	x	°	°	x	-	-	x	Tambacu

13224	x	x	-	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13225	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13226	x	x	-	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13227	x	-	-	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13228	x	x	-	x	-	x	°	°	-	x	Híbrido F1
13229	x	-	-	x	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13230	x	-	-	x	-	x	-	-	-	x	Híbrido F1
13231	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13232	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13233	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13234	°	°	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13235	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13236	°	°	x	-	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13237	°	°	x	-	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13238	-	x	x	-	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13239	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13240	-	x	x	x	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13241	x	x	-	-	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13242	-	x	x	x	-	x	-	-	-	x	Híbrido F1
13243	-	x	x	-	-	x	°	°	-	x	Híbrido F1
13244	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13245	-	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13246	x	-	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13247	-	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13248	-	x	x	x	x	-	x	x	-	x	Tambacu
13249	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13250	x	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu

13251	-	x	-	x	-	x	-	x	-	x	<i>C. macropomum</i>
13252	-	x	x	-	-	x	-	-	-	x	Híbrido F1
13253	x	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13254	-	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13255	-	x	x	-	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13256	-	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13257	-	x	-	x	x	-	-	x	-	x	Híbrido F1
13258	-	x	x	-	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13259	-	x	°	°	x	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13260	x	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13261	-	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13262	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	Tambacu
13263	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13264	-	x	x	-	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13265	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13266	-	x	x	x	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13267	-	x	x	-	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13268	-	x	x	-	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13269	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13270	-	x	-	-	x	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13271	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13272	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13273	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13274	x	x	x	x	x	x	x	-	-	x	Tambacu
13275	x	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13276	x	-	x	x	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13277	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu

13286	-	x	x	x	-	x	-	x	-	x	Híbrido F1
13287	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	Tambacu
13288	-	x	x	-	-	x	x	x	-	x	Tambacu
13290	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	Tambacu
13291	-	x	°	°	-	x	-	x	-	x	<i>C. macropomum</i>

P.m – *P. mesopotamicus* (Pacu); **C.m** – *C. macropomum* (Tambaqui); ° = Sem resultados no marcador; x = Presença de banda diagnóstica; - = Ausência de banda diagnóstica.

Tabela 3. Resultados das análises de Pintado Real da Piscicultura A.

Identificação da amostra	RAG			16S			Globina		Prt3			Prt6			Prt12			Prt30			Identificação genética
	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	
12965	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	-	-	x	°	°	°	Pintado Real
12966	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	x	x	-	x	Pintado Real
12967	x	-	x	-	-	-	°	°	x	-	x	x	-	x	-	-	x	x	-	x	Pintado Real
12968	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	-	x	-	-	-	x	Pintado Real
12969	-	x	x	-	x	-	-	x	-	x	x	-	x	-	-	x	-	-	-	x	Híbrido F1
12970	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	x	-	x	Pintado Real
12971	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	-	x	Pintado Real
12972	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	x	-	x	-	x	Pintado Real
12973	x	-	x	-	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	-	x	x	°	°	°	Pintado Real
12974	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	x	Pintado Real
12975	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	x	x	-	Pintado Real
12976	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	Pintado Real
12977	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	x	x	-	x	-	x	°	°	°	Pintado Real
12978	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	-	-	x	x	-	x	Pintado Real
12979	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	Pintado Real

12980	-	x	x	-	x	-	-	x	-	x	x	-	-	x	-	x	x	-	x	-	Híbrido F1
12981	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	°	°	°	x	x	-	x	-	-	Pintado Real
12982	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	Pintado Real
12983	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	Pintado Real
12984	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	x	x	x	-	°	°	°	Pintado Real
12985	-	x	x	-	x	-	°	°	-	x	x	-	x	x	-	x	x	-	x	-	Cachandía

12986	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	-	x	x	x	-	x	Pintado Real
12987	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	-	x	Pintado Real
12988	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	-	x	-	-	x	-	-	-	x	Cachandiá
12989	x	-	x	-	-	-	x	x	x	-	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	Ponto e Vírgula
12990	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	-	Pintado Real
12991	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	-	-	Pintado Real
12992	-	-	-	-	x	-	x	x	x	x	-	-	x	-	x	x	-	x	x	-	Pintado Real
12993	-	x	x	-	-	-	x	x	x	x	-	-	x	x	-	x	x	°	°	°	Pintado Real
12994	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	-	x	x	-	x	x	°	°	°	Pintado Real

P.c – *Pseudoplatystoma corruscans* (Pintado); **P.r** – *Pseudoplatystoma reticulatum* (Cachara); **L.m** – *Leiarius marmoratus* (Jandiá);); ° = Sem resultados no marcador; x = Presença de banda diagnóstica; - = Ausência de banda diagnóstica.

Tabela 4. Resultados das análises de Pintado Real da Piscicultura B

Identificação da amostra	RAG			16S			Globina		Prt3			Prt6			Prt12			Prt30			Identificação genética
	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	P.c	P.r	L.m	
13151	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	Pintado Real
13152	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	x	-	x	Pintado Real
13153	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	o	o	o	Pintado Real
13154	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	Pintado Real
13155	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	Pintado Real
13156	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	-	x	o	o	o	o	o	o	Pintado Real
13157	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	x	-	x	x	x	-	-	x	x	Pintado Real
13158	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	Pintado Real
13159	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	-	x	Pintado Real
13160	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	-	x	x	Pintado Real
13161	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	-	o	o	o	-	x	x	Pintado Real
13162	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	-	x	x	Pintado Real
13163	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	o	o	o	o	o	o	Pintado Real
13164	-	x	x	-	x	-	-	x	-	x	x	-	x	-	-	x	-	-	-	x	Híbrido F1
13166	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	o	o	o	Pintado

																					Real
13167	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	°	°	°	Pintado Real
13168	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	x	x	-	Pintado Real
13169	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	Pintado Real
13170	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	Pintado Real
13171	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	-	x	x	x	x	-	-	-	x	Pintado Real
13172	-	x	-	-	x	-	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	-	-	x	Pintado Real

13173	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	Pintado Real
13174	-	-	x	-	x	-	x	x	-	-	x	-	-	x	-	x	x	x	x	-	Pintado Real
13175	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	-	-	-	x	x	x	x	-	Pintado Real
13176	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	x	x	-	x	x	Pintado Real
13177	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	-	x	x	x	-	x	x	-	x	Pintado Real
13178	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	Pintado Real
13179	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	-	x	x	-	-	-	x	x	Pintado Real
13180	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	-	-	-	x	x	-	x	x	-	Pintado Real
13181	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	x	x	-	x	-	x	x	-	-	Pintado Real
13182	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	-	x	x	x	x	-	-	-	-	Pintado Real
13183	-	x	x	-	x	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-	x	x	-	x	x	Híbrido F1
13187	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	-	x	Pintado Real
13188	x	-	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-	x	-	Pintado Real
13189	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	-	x	x	-	x	Pintado Real
13190	-	x	x	-	x	-	x	-	-	x	x	x	x	-	-	x	x	x	x	-	Pintado Real
13191	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	x	-	-	-	x	-	-	-	Pintado Real
13192	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	-	Pintado

																				Real	
13193	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	x	x	-	x	-	-	x	-	-	x	Pintado Real
13194	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	x	x	-	-	-	x	x	x	-	Pintado Real
13195	-	x	x	-	x	-	°	°	-	-	x	-	-	-	-	x	x	-	-	x	Híbrido F1
13196	x	-	x	-	x	-	°	°	x	-	-	-	x	x	-	x	x	°	°	°	Pintado Real
13197	-	x	x	-	x	-	-	x	-	x	x	-	x	x	-	x	x	-	x	-	Cachandía
13198	x	-	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	-	-	x	x	x	x	-	Pintado Real
13199	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	-	x	x	x	-	Pintado Real

13200	-	x	x	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x	-	-	x	-	-	Pintado Real
-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--------------

P.c – *Pseudoplatystoma corruscans* (Pintado); **P.r** – *Pseudoplatystoma reticulatum* (Cachara); **L.m** – *Leiarius marmoratus* (Jandiá);); ° = Sem resultados no marcador; x = Presença de banda diagnóstica; - = Ausência de banda diagnóstica.