

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MESTRADO

Caracterização citogenética e molecular das espécies pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos utilizados na piscicultura brasileira

Fernanda Dotti do Prado

Botucatu, SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Fernanda Dotti do Prado

**Caracterização citogenética e molecular das espécies pintado
(*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma
reticulatum*) e seus híbridos utilizados na piscicultura brasileira**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas. Área de
Concentração: Genética.

Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti

Botucatu, SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Prado, Fernanda Dotti do.

Caracterização citogenética e molecular das espécies pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos utilizados na piscicultura brasileira / Fernanda Dotti do Prado. – Botucatu : [s.n.], 2010.

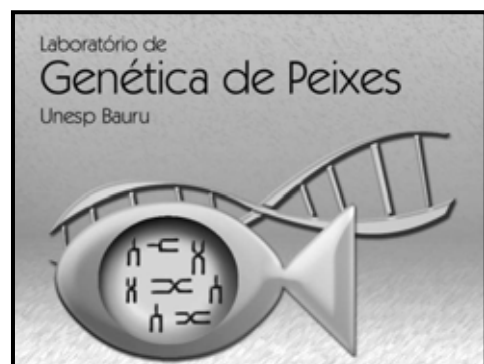
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientador: Fábio Porto Foresti

Assunto CAPES: 20204000

1. Peixe - Genética 2. Genética molecular

Palavras-chave: Citogenética de peixes; Conservação genética; Hibridação interespecífica; Marcadores moleculares; *Pseudoplatystoma*



“Não podemos ganhar a batalha de salvar as espécies e os ambientes se não formarmos uma ligação emocional entre nós e a natureza... Temos de deixar espaço para a natureza em nossos corações.”

(Stephen J. Gould, 1991).

Dedico este trabalho à minha mãe Luzia, pelo amor incondicional, paciência, esforço e dedicação, indispensáveis para a minha formação pessoal e profissional e para a realização dos nossos sonhos.

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento especial às Instituições e pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, em particular:

Ao Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Bauru, pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro concedido (Processo nº 07/57320-6).

Ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, por todas as oportunidades oferecidas, por estar sempre presente durante a iniciação científica e mestrado, orientando e ensinando, e principalmente, agradeço pela amizade e incentivos.

Ao Prof. Dr. Jehud Bortolozzi, pelos ensinamentos, pela amizade e por todos os momentos de alegria e descontração no laboratório, que só somaram para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pelo apoio e oportunidades, muito importantes para o meu aprimoramento acadêmico.

Ao Dr. José A. Senhorini, do CEPTA, por todo apoio durante o projeto e pelos exemplares de peixes fornecidos para a realização deste trabalho.

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade e pelo auxílio em algumas etapas práticas necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos que estão presentes ou já passaram pelo laboratório de Genética de Peixes de Bauru: Aline, Álvaro, Ana, Ângela, Bruna, Carol, Dani, Fernanda Malta, Fernanda Cugola, Fernanda Dias, Jake, Josi, Keila, Luíza, Nayara, Manolo, Mariana, Nelson, Robson, Rosângela, Sandro, Vanessa e, em especial ao Diogo e Tatiana, obrigada por toda a ajuda durante a realização deste trabalho, além da amizade e dos momentos alegres no laboratório, viagens e eventos científicos.

Aos amigos da graduação que compartilharam comigo muitas alegrias e dificuldades, em especial André, Juliana, Gabriel (Woody), Gisele, Marília e Márcio.

A todos os meus amigos, pela confiança e lealdade, e por todos os momentos que passamos juntos, que nos ensinaram muito e com certeza permanecerão para sempre conosco. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao André, por estar sempre presente, me incentivando e proporcionando momentos tão felizes, obrigada por tudo meu amigo.

A Simony e ao Thiago, companheiros em todas as horas, pelo apoio, amizade e toda alegria, disposição e confiança que transmitem a todo o momento.

As pessoas que se tornaram parte da minha família, Henrique, Geraldo, Marcinha e Nancy, pela amizade, carinho e incentivos.

Ao meu namorado Felipe (Batche), pelo amor e companheirismo... Por me ensinar muito a cada dia, estar sempre ao meu lado acreditando no que estamos construindo juntos e fazendo a minha vida mais completa e feliz.

A minha mãe Luzia, meus avós Maria Teresa, Margarida e Candido, tios Ana, José, Marcos, Mali e Teresinha e prima Rosa, pelo incentivo e confiança em mim depositados e por todo amor, esforço e dedicação, indispensáveis para a minha formação pessoal e profissional. Devo tudo a vocês.

RESUMO

A hibridação artificial interespecífica de peixes é utilizada em diversos estabelecimentos voltados à piscicultura no país, com a finalidade de produzir indivíduos mais vantajosos e favoráveis para o cultivo. Porém, devido principalmente às dificuldades encontradas na identificação dos híbridos, esta prática pode determinar o surgimento de sérios problemas como a contaminação genética dos estoques de cultivo, a comercialização de produtos híbridos como espécies puras, a introdução de espécies exóticas e escapes de produtos de piscicultura para o ambiente natural e até eventos de introgressão genética e extinção das espécies nativas. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo analisar geneticamente exemplares das linhagens parentais de *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) e seus híbridos interespecíficos “pintachara” (macho de pintado x fêmea de cachara) e “cachapinta” (fêmea de cachara x macho de pintado), provenientes dos estoques de cultivo do CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP, a fim de identificar e estabelecer marcadores genéticos para possibilitar sua identificação e diferenciação. Também foram analisadas geneticamente amostras de *P. corruscans* e *P. reticulatum* coletadas no Rio Paraguai, MS (bacia do Paraguai) e de *P. corruscans* capturados do rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná), a fim de identificar a possível ocorrência de híbridos entre estas espécies na natureza. As análises citogenéticas revelaram um número diploide de $2n=56$ cromossomos para ambas as espécies parentais, com cariótipos caracterizados por cromossomos dos tipos $20m+12am+12st+12a$ e número fundamental (NF) igual a 100, indicando uma fórmula cariotípica conservada entre estas espécies. A análise dos padrões de heterocromatina pelo bandamento C revelou blocos heterocromáticos localizados nas porções terminais e pericentroméricas de alguns cromossomos, sendo a NOR simples e os genes ribossômicos 5S localizados em dois cromossomos subtelocêntricos distintos da posição da NOR, tanto em *P. corruscans* como em *P. reticulatum*, corroborando dados sobre o padrão citogenético mais freqüente na família Pimelodidae. Os híbridos mantiveram as mesmas características citogenéticas dos seus parentais. Porém, verificou-se a ocorrência de uma variação do número de cromossomos portadores da NOR, possivelmente devido ao fenômeno de dominância nucleolar. Apesar da importância da caracterização dos cromossomos destas espécies e seus

híbridos, as técnicas citogenéticas utilizadas não permitiram uma completa e definitiva distinção entre elas. A perfeita diferenciação entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* e a identificação de seus híbridos interespecíficos recíprocos foi realizada somente com a aplicação das técnicas moleculares de PCR-RFLP e PCR multiplex de regiões do gene nuclear RAG2 e do gene mitocondrial 16S. Quando estes marcadores foram aplicados nos indivíduos das amostras provenientes do ambiente natural, mostraram a ocorrência de indivíduos híbridos “pintachara” e “cachapinta” tanto no rio Paraguai, MS (bacia do Paraguai) quanto no rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná). Possivelmente este fato seja devido à ocorrência de escapes destes animais de estações de pisciculturas ou “pesque-pagues” da região, indicando que a contaminação do ambiente natural com animais originários de cultivo já está acontecendo em algumas regiões brasileiras. Devido ao seu baixo custo e pouco de tempo de execução, os marcadores moleculares desenvolvidos neste trabalho mostraram ser um método seguro para ser aplicado no controle e fiscalização adequada dos produtos da piscicultura e na comercialização dos híbridos produzidos, além de fornecer subsídios para o desenvolvimento de programas de proteção e conservação das populações naturais de *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Palavras chave: *Pseudoplatystoma*; Hibridação interespecífica; Citogenética de peixes; Marcadores moleculares; Conservação genética.

ABSTRACT

Artificial interspecific hybridization of fish is used in various establishments linked to fish farming in the country, in order to produce individuals more advantageous and favorable for cultivation. However, due mainly to difficulties in the hybrid products identification, this practice may determine the onset of serious problems such as genetic contamination of the breeder stocks, marketing of hybrids as pure species, introduction of exotic species and escapes of farmed products to the natural environment and sometimes leading to events of genetic introgression and extinction of native species. In such context, the present study aimed to analyze genetically copies of the parental lines of *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) and *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) and their interspecific hybrids "pintachara" (female of pintado x male of cachara) and "cachapinta" (female of cachara x male of pintado), from the stocks maintained in CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP, in order to characterize and establish genetic markers to allow their identification and differentiation. Samples of *P. corruscans* and *P. reticulatum* collected in the Paraguay river, MS (Paraguay basin) and *P. corruscans* captured in Mogi-Guaçu river, SP (Alto Paraná basin), also were genetically analyzed in order to identify the possible occurrence of hybrids between these species in nature. The cytogenetic analysis revealed a diploid number of $2n = 56$ chromosomes for both parental species with karyotypes characterized by the formula $20m+12am+12st+12a$ and fundamental number (NF) of 100, indicating a karyotypic formula conserved among these species. The analysis of the heterochromatin C-banding patterns revealed heterochromatic blocks located in the pericentromeric and terminal portions of some chromosomes, the NOR was simple and located in one chromosome pair and 5S ribosomal genes located on two different subtelocentric chromosomes distinct to the NOR carrying sites in both *P. corruscans* and *P. reticulatum*, corroborating data on the standard cytogenetic pattern found among representatives of the Pimelodidae family. Hybrids presented the same cytogenetic characteristics of their parents. However, a change in the number of the NOR-bearing chromosomes found in these individuals possibly may be due to nucleolar dominance. Despite the importance in the characterization of the chromosomes of these species and their hybrids, the cytogenetic techniques used did not allow to a complete and definitive distinction among them. A good differentiation between *P. corruscans* and *P. reticulatum* and

the identification of their reciprocal interspecific hybrids was obtained only with the application of molecular techniques of PCR-RFLP and multiplex PCR in regions of the nuclear RAG2 and mitochondrial 16S genes. The application of these markers to analyze samples of individuals captured in the natural environment, revealed the occurrence of hybrid individuals "pintachara" and "cachapinta" both in the Paraguay river, MS (Paraguay Basin) and in the Mogi Guaçu river, SP (Alto Parana basin). This fact is possibly due to the occurrence of escapes of animals from fish hatcheries or fish-and-pay sites in the region, indicating that the occurrence of contamination of the natural environment with animals originated from farming is already happening in some regions of the country. Due to its low cost and little time for implementation, the molecular markers developed in this work for these species proved to be a safe method to be applied in the control and adequate oversight of the fish farm products and marketing of hybrids, and provides subsidies for the development of programs for the protection and conservation of natural populations of *P. corruscans* and *P. reticulatum*.

Keywords: *Pseudoplatystoma*; Interspecific hybridization; Fish cytogenetics; Molecular markers; Genetic conservation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hibridação interespecífica em peixes	2
1.2 Riscos ocasionados pela hibridação interespecífica	4
1.3 Identificação de híbridos	7
1.3.1 Métodos citogenéticos	8
1.3.2 Métodos moleculares	11
1.4 Considerações sobre as espécies parentais e seus híbridos	13
1.5 Estudos citogenéticos na família Pimelodidae (Siluriformes)	17
1.6 Objetivos	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Material	21
2.2 Métodos	25
2.2.1 Métodos citogenéticos	25
2.2.1.1 Estimulação de mitoses	26
2.2.1.2 Obtenção de cromossomos mitóticos de peixes (técnica <i>in vivo</i>)	26
2.2.1.3 Detecção da região organizadora de nucléolo (Ag-NOR)	28
2.2.1.4 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda C)	28
2.2.1.5 Bandamento com o fluorocromo cromomicina A ₃ (CMA ₃)	29
2.2.1.6 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sondas de DNAr	30
2.2.2 Estudos cariotípicos	33
2.2.3 Montagem dos cariótipos	33
2.2.4 Marcação dos exemplares	33
2.2.5 Métodos moleculares	34

<i>2.2.5.1 Extração e purificação de DNA</i>	35
<i>2.2.5.2 Amplificação do gene nuclear RAG2 e mitocondrial 16S</i>	37
<i>2.2.5.3 Purificação dos produtos amplificados por PCR</i>	38
<i>2.2.5.4 Reação de amplificação para o seqüenciamento</i>	39
<i>2.2.5.5 Limpeza dos fragmentos marcados</i>	39
<i>2.2.5.6 Análises de PCR-RFLP</i>	40
<i>2.2.5.7 Análises de PCR multiplex</i>	40
3 RESULTADOS	41
3.1 Capítulo 1	42
3.2 Capítulo 2	59
3.3 Capítulo 3	72
4 DISCUSSÃO GERAL	85
5 CONCLUSÕES	90
6 REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

A aqüicultura é uma atividade zootécnica difundida no mundo inteiro desde a antiguidade e se destina ao cultivo de organismos aquáticos. Esta atividade experimentou um crescimento surpreendente nas últimas décadas, com um aumento anual de menos de um milhão de toneladas no início dos anos 50 para 51,7 milhões de toneladas em 2006 (FAO, 2008). De acordo com estes dados, a piscicultura correspondeu à maior fração, contribuindo com mais da metade da produção mundial.

O Brasil, apesar de seu grande potencial, possui a maior parte da produção de peixes continentais ainda proveniente da pesca extrativista, estimada em cerca de 250 mil toneladas no ano de 2006 (FAO, 2008). Entretanto, embora reduzido, o cultivo de organismos aquáticos tem aumentado no país, representando atualmente cerca de 15-25% da produção total de pescado (Godinho, 2007).

Os principais estudos genéticos aplicados em pisciculturas mundiais e brasileiras até a década de 90 foram revisados em uma série de publicações denominadas “Cadernos de Ictiogenética” (Toledo-Filho *et al.*, 1992, 1994, 1996, 1998 e 1999). Segundo estes autores, a partir dos anos 80, abordagens genéticas passaram a contribuir de maneira efetiva nos programas de criação de peixes, e, com o emprego de técnicas clássicas e modernas, passou a ser possível a manipulação cromossômica e a obtenção de linhagens que apresentam vantagens para a comercialização. Entre as principais biotecnologias aplicadas em pisciculturas brasileiras durante as últimas décadas estão as metodologias clássicas de manipulação cromossômica, como a obtenção de linhagens poliplóides,

ginogenéticas e androgenéticas, processos de reversão sexual e hibridação entre diferentes espécies de peixes (Toledo-Filho *et al.*, 1994, 1996 e 1998).

1.1 Hibridação interespecífica em peixes

O fenômeno da hibridação é definido como a fusão de dois patrimônios genéticos diferentes, cujos produtos podem apresentar caracteres taxonômicos intermediários (Mayr, 1963). Segundo Bartley *et al.* (2001), a hibridação também pode ser conceituada como o cruzamento de grupos ou indivíduos geneticamente diferenciados, e pode envolver tanto cruzamentos entre linhagens dentro de uma mesma espécie quanto entre indivíduos de espécies diferentes.

Dentre os diversos grupos de vertebrados, a hibridação natural entre diferentes espécies de peixes é um fenômeno bastante comum (Hubbs, 1955 e 1961). Isto ocorre pela própria condição ecofisiológica deste grupo de organismos que apresenta características peculiares as quais facilitam o surgimento de indivíduos híbridos, como a fertilização externa, os mecanismos de isolamento existentes, a competição por territórios de desova, a abundância de espécies e a convivência em ambientes limitados (Hubbs, 1955).

A visão mais comum sobre a hibridação natural é que esta não possui um papel evolutivo importante. Este ponto de vista se baseia na observação que os híbridos entre diferentes táxons apresentam baixos níveis de viabilidade ou fertilidade, e que, principalmente nos animais, a hibridação bem-sucedida é um fenômeno raro (Mayr, 1963). Contudo, para alguns pesquisadores, a hibridação natural é considerada um fenômeno que teria um importante papel para a evolução dos organismos, por possibilitar o surgimento de genótipos que poderiam estabelecer novas linhagens evolutivas (Arnold e Hodges, 1995).

Contudo, o incremento das atividades humanas tem contribuído significativamente para o aumento das taxas de hibridação em plantas e animais (Hubbs, 1955; Rhymer e Simberloff, 1997). Em uma revisão feita por Scribner *et al.* (2001), de 163 eventos de hibridação verificados em espécies de peixes, 81 envolviam direta ou indiretamente influência humana, como a degradação do ambiente natural, o desenvolvimento da hibridação artificial em programas de aquicultura e a introdução de espécies não nativas no ambiente natural. Entre estas atividades, a aquicultura foi o fator que prevaleceu, correspondendo a 39% das causas de eventos de hibridação.

Entre os principais objetivos da hibridação artificial está a produção de animais com melhor desempenho que suas espécies parentais, como o aumento da taxa de crescimento, maior qualidade da carne, resistência a doenças e capacidade de tolerar variações ambientais, além do aperfeiçoamento de diversas outras características, a fim produzir peixes mais proveitosos para o cultivo, o que também pode ser chamado de vigor híbrido (Toledo-Filho *et al.*, 1994 e 1998; Bartley *et al.*, 2001). Segundo Toledo-Filho *et al.* (1998), esta técnica tem sido utilizada em programas de melhoramento genético de fenótipos com baixa herdabilidade, na produção de híbridos com heterose e na produção de linhagens estéreis, monossexuais, poliplóides, androgenéticas e ginogenéticas de peixes.

Híbridos interespecíficos representam uma porção substancial da produção de peixes, contribuindo de modo decisivo na economia de diversos países (Toledo-Filho *et al.*, 1996; Hulata, 2001; Scribner *et al.*, 2001). No Brasil, a utilização da hibridação teve início aproximadamente há 25 anos, envolvendo tilápias, no Departamento de Obras Contra a Seca (DNOCS) (Toledo-Filho *et al.*, 1998). Utilizando a mesma tecnologia, em 1985 o Centro de Pesquisa de Peixes

Continentalis (CEPTA, Pirassununga, SP) produziu o “tambacu”, híbrido interespecífico entre a fêmea de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e macho de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Bernardino *et al.*, 1986). A partir de então, houve um crescente interesse pela aplicação desta metodologia e atualmente, diversas espécies têm sido utilizadas com sucesso em programas com este objetivo, envolvendo “peixes redondos” como o pacu, tambaqui e pirapitinga, espécies do gênero *Leporinus* como o piauçú e a piapara, e grandes bagres Siluriformes como o pintado, cachara, jandiá e pirarara (Godinho, 2007; Porto-Foresti *et al.*, 2008).

1.2 Riscos ocasionados pela hibridação interespecífica

Um dos principais problemas práticos em programas de hibridação artificial é a falta de informações precisas sobre quais seriam os produtos genéticos resultantes de uma hibridação bem-sucedida (Toledo-Filho *et al.*, 1994), assim como os reais benefícios e custos de utilização de híbridos para fins de consumo (Epifanio e Nielsen, 2001). Os riscos genéticos potenciais dos híbridos variam de intensidade, dependendo basicamente de três fatores: o grau de fertilidade que apresentam; a capacidade de caracterização dos híbridos por sua morfologia, levando os piscicultores ao risco de usarem inadvertidamente os híbridos no lugar dos parentais como reprodutores; a ocorrência ou produção de híbridos na natureza, devido à introdução de espécies biologicamente relacionadas às nativas, ou ainda a introdução dos híbridos em rios, açudes ou reservatórios de hidrelétricas pela ocorrência de escapes (Toledo-Filho *et al.*, 1998).

Apesar das vantagens zootécnicas e biológicas que os híbridos possam apresentar, é difícil prever quais seriam os produtos exatos resultantes da hibridação em peixes, os quais podem ser variáveis e heterogêneos (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

Ainda que a maioria dos híbridos possa apresentar qualidades favoráveis ao seu cultivo, nem todos expressam o almejado vigor híbrido, sendo que os níveis de viabilidade destes animais podem variar, representando classes genotípicas com desempenho menor, equivalente ou mais alto que o das espécies parentais (Arnold e Hodges, 1995).

É considerado também que estes animais apresentem caracteres taxonômicos intermediários entre as espécies parentais, em relação à anatomia interna e externa, à coloração, estrutura e forma geral do corpo, ao tamanho e cor das escamas, ao número de caracteres merísticos (vértebras, rastros branquiais, raios de nadadeiras e dentes), ao tamanho da cabeça e proporções corporais com relação às medidas do tronco (Hubbs, 1955). Apesar disso, sabe-se que os híbridos também podem apresentar um mosaico de características morfológicas herdadas dos parentais e, quando tomados individualmente, podem ser inferiores, superiores ou semelhantes a um dos parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

Em relação à fertilidade, híbridos de peixes podem apresentar desde completa esterilidade até indivíduos portadores de gônadas com maturação sexual normal em ambos os sexos (Chevassus, 1983). Estudos sugerem que os representantes deste grupo são menos suscetíveis a incompatibilidades severas de desenvolvimento quando comparados com híbridos interespecíficos de outros grupos de vertebrados (Thorgaard e Allendorf, 1988). Esta hipótese enfatiza o aspecto de que, em peixes, mesmo os gametas com complementos cromossômicos desequilibrados podem manter parcialmente suas capacidades genéticas e funcionais, podendo gerar descendentes viáveis e gerações híbridas pós F_1 (híbridos F_2 e retrocruzamentos destes híbridos com as espécies parentais) (Toledo-Filho *et al.*, 1996).

Em estoques cultivados, a semelhança morfológica dos híbridos com os seus parentais podem vir a causar uma mistura ocasional destes e resultar na formação de plantéis de reprodutores contendo indivíduos com esterilidade zigótica ou gamética. Segundo Ferguson e Thorpe (1991), em pisciculturas da Hungria e da ex-Tchecoslováquia, híbridos causaram “contaminação genética” nos estoques parentais de carpas cabeça-grande e prateada. Caso os híbridos sejam férteis, a produção de linhagens pós F_1 pode comprometer a produção, pois estas linhagens geralmente apresentam características zootécnicas e comerciais não desejáveis relacionadas à reprodução, decréscimo da taxa de crescimento e alterações de hábitos alimentares (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

Os riscos também se aplicam ao meio ambiente, uma vez que os híbridos podem ser introduzidos ou cair na natureza, principalmente através de escapes de pisciculturas (Orsi e Agostinho, 1999). Os "pesque-pague", recentes estabelecimentos comerciais de lazer que exploram a pesca esportiva de diferentes espécies de peixes, representam riscos adicionais, principalmente devido ao despreparo dos proprietários em relação a aspectos da conservação ambiental e ao fato que os escapes são praticamente inevitáveis (Fernandes *et al.*, 2003).

Na natureza, mesmo inférteis, os problemas dos híbridos com os peixes selvagens são decorrentes de competição por espaço e alimento (Einum e Fleming, 1997). Por outro lado, se os híbridos apresentarem características sexuais secundárias e capacidade de cópula, podem realizar cruzamentos mal sucedidos com as espécies parentais, não redundando em descendência viável, o que, a longo prazo, pode interferir negativamente na dinâmica reprodutiva das espécies parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1996).

Caso sejam parcialmente ou totalmente férteis, híbridos podem provocar

contaminação através de um fenômeno chamado introgressão genética, onde os genes de uma das espécies parentais são lentamente incorporados ao patrimônio genético da outra espécie (Huxel, 1999; Epifanio e Philipp, 2001). Mesmo em face de um forte gradiente de adaptação favorecendo os taxa parentais, pode ocorrer o surgimento de populações compostas quase inteiramente por linhagens híbridas, ocasionando a perda da identidade genética e até a extinção das espécies puras (Epifanio e Philipp, 2001; Allendorf *et al.*, 2001).

1.3 Identificação de híbridos

A identificação e diferenciação de espécies parentais puras e seus híbridos é uma etapa essencial a fim de evitar os riscos que a hibridação pode representar e possibilitar a realização de um manejo adequado destes animais, evitando a contaminação de estoques de cultivo, escapes de pisciculturas e problemas genéticos e ecológicos para o meio ambiente (Toledo-Filho *et al.*, 1994). O monitoramento genético de produtos resultantes de processos de hibridação consiste no uso de metodologias que possibilitam encontrar características diagnósticas que identifiquem, de maneira clara e acessível, parentais e híbridos (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

Entre as metodologias propostas na literatura que podem ser aplicadas na busca de informações diagnósticas sobre a hibridação em peixes estão as que utilizam parâmetros morfológicos ou genéticos. Scribner *et al.* (2001) relatou que a maioria dos trabalhos de identificação de híbridos empregam métodos morfológicos (45%), seguidos de alozimas (35%), DNA mitocondrial (12%), DNA nuclear (4%) e cariótipos (2%). Apesar da detecção de híbridos através de dados morfológicos ter base nas características intermediárias destes animais em relação a seus parentais,

o fato de muitos híbridos F₁ apresentarem um mosaico de fenótipos parentais torna esta metodologia confusa e de aplicação duvidosa (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

Avanços recentes em biotecnologia têm expandido o número de técnicas genéticas disponíveis para estudos que envolvam a hibridação, possibilitando uma identificação confiável de espécies parentais e linhagens híbridas produzidas em cativeiro e, em alguns casos, servindo como evidência da ocorrência de hibridação e introgressão genética em ambientes naturais (Padhi e Mandal, 1997; Ward, 2000; Scribner *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2009c). Entre as técnicas genéticas disponíveis estão os métodos genético-bioquímicos (utilizando-se alozimas e isozimas), citogenéticos (análises de ploidia, morfologia e estrutura cromossômica), e genético-moleculares (estudo de regiões específicas do DNA nuclear e mitocondrial).

1.3.1 Métodos citogenéticos

A aplicação de técnicas citogenéticas em projetos que envolvam a hibridação é considerada uma das etapas iniciais a ser realizada na identificação genética de híbridos interespecíficos, a qual constitui o método mais acurado para se verificar tanto os níveis de ploidia e morfologia dos cromossomos, como a procedência dos complementos cromossômicos dos parentais nos produtos resultantes da hibridação (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

A utilização de métodos de coloração e bandamentos cromossômicos clássicos e modernos é útil para a caracterização da estrutura e organização dos cromossomos de espécies parentais e híbridos, assim como na busca de marcadores cromossômicos que os diferenciem (Almeida Toledo *et al.*, 1995; Park *et*

al., 2003; Porto-Foresti *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2009a; Hashimoto *et al.*, 2009b).

Em estudos citogenéticos realizados em pacus e tambaquis diploides e seus híbridos recíprocos, Almeida-Toledo *et al.* (1987) verificaram que estas espécies apresentam número diploide de $2n=54$ cromossomos e, pela coloração normal com Giemsa, cariótipos idênticos em relação à morfologia dos cromossomos. Nestes experimentos foi encontrado um híbrido triplóide proveniente destes mesmos cruzamentos, o qual apresentava um cariótipo com 81 cromossomos ($3n$). Em alguns casos, contudo, é possível descrever diferenças cariótipicas entre o híbrido e seus parentais devido à diferença na morfologia cromossômica e/ou número fundamental existente entre as espécies, como demonstrado no caso do híbrido Tilápia Vermelha, resultante do cruzamento entre *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus* (Manosroi *et al.*, 2003), onde parentais e híbridos tiveram o número diploide de 44 cromossomos, mas apresentaram diferenças na constituição do cariótipo.

Nos casos em que híbridos e parentais apresentaram um número diploide igual e um cariótipo similar em número e morfologia, técnicas de colorações diferenciadas e bandamentos cromossômicos possibilitaram a perfeita identificação de híbridos entre as espécies pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Almeida-Toledo *et al.*, 1987) e também dos parentais das espécies *Leporinus elongatus* e *Leporinus macrocephalus* e do híbrido “piaupara” obtido desses cruzamentos interespecíficos (Porto-Foresti *et al.*, 2008).

Espécies de carpas e seus híbridos interespecíficos apresentaram $2n=48$ cromossomos, sendo indistinguíveis através da coloração com Giemsa. Porém, marcações de banda C possibilitaram a diferenciação entre os híbridos e parentais

(Almeida Toledo *et al.*, 1995). Já os híbridos entre as espécies *Pleuronectes ferrugineus* e *P. americanus* foram identificados pela caracterização de regiões satélites em seus cromossomos (regiões correspondentes às NORs), onde somente *P. americanus* possuía um par de acrocêntricos marcados e apenas um cromossomo foi identificado no híbrido (Park *et al.*, 2003).

Entretanto, em alguns casos, as análises citogenéticas não possibilitam a obtenção de marcadores cromossômicos que diferenciem híbridos interespecíficos das espécies parentais, como verificado por Brinn *et al.* (2004). Estes autores verificaram que duas espécies do gênero *Cichla* e seus híbridos F₁ apresentaram o mesmo número diploide e morfologia cromossômica similar. Em outra pesquisa, híbridos de *Coregonus* mostraram características citogenéticas variáveis intra e inter individualmente, não sendo possível a identificação dos híbridos com clareza com o uso desta técnica (Kirtiklis e Jankun, 2006).

Características citogenéticas conservadas entre as espécies parentais também podem estar relacionadas com a fertilidade de seus híbridos, como verificado em *Rutilus rutilus* e *Blicca bjoerkna*, que possuem o mesmo número diploide e produzem híbridos interespecíficos férteis (Matondo *et al.*, 2007). Neste caso, a constituição cromossômica de ambas as espécies parentais pode ser altamente homóloga, possibilitando o pareamento e segregação durante a meiose e a produção de gametas viáveis pelos híbridos F₁ (Nikoljukin, 1946).

O emprego de técnicas citogenéticas é, portanto, uma etapa importante a ser realizada no estudo de híbridos de peixes, a fim de obter um conhecimento inicial sobre os cromossomos destes animais e na busca de marcadores citogenéticos que os identifiquem.

1.3.2 Métodos moleculares

Com o advento de técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de análise de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA, com base na detecção da variabilidade de regiões do genoma nuclear e mitocondrial (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Atualmente, diversos tipos de marcadores moleculares têm sido aplicados na aquicultura mundial, fornecendo valiosas informações a respeito da variabilidade genética e endogamia, relacionamentos de parentesco e identificação de híbridos e linhagens em programas de cultivo, possibilitando o manejo e o monitoramento genético adequados de diversas espécies cultivadas (Liu e Cordes, 2004).

Com a aplicação de técnicas genéticas na análise de polimorfismos do DNA nuclear, é possível obter marcadores moleculares específicos para cada espécie parental e identificar seus híbridos interespecíficos através de um padrão heterozigoto em relação aos seus parentais (Hashimoto *et al.*, 2009c). Já o DNA mitocondrial, por apresentar herança materna, altas taxas de evolução e facilidade de isolamento e caracterização (Awise, 1986; Moritz *et al.*, 1987), pode ser utilizado para aperfeiçoar os estudos de hibridação, pois permite o estabelecimento do cruzamento que deu origem ao híbrido analisado, ou seja, a identidade do parental materno envolvido. Entretanto, pelo seu modo de herança uniparental, marcadores mitocondriais não possibilitam a detecção de híbridos interespecíficos e devem ser utilizados em conjunto com outros marcadores nucleares (Scribner *et al.*, 2001).

O RFLP constitui uma das classes de marcadores moleculares mais amplamente utilizadas em genética. Através da atividade de enzimas de restrição é possível a detecção de polimorfismos dos fragmentos de DNA clivados pela enzima, os quais podem variar entre indivíduos, espécies ou populações. Tradicionalmente,

os fragmentos RFLP podem ser visualizados por meio de “Southern Blot” através da transferência do DNA digerido para uma membrana e posterior hibridização com uma sonda específica (Southern, 1976). Em estudos de hibridação em peixes, RFLP de DNA nuclear foi utilizado com sucesso na diferenciação de espécies parentais e híbridos de salmão (Perez *et al.*, 1999).

Mais recentemente, a obtenção de marcadores RFLP tem sido realizada em conjunto com a técnica de PCR (PCR-RFLP) (Teletchea, 2009). Neste caso, a região genômica de interesse é obtida através da amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction), digerida com uma enzima de restrição específica e diretamente visualizada através de eletroforese em gel de agarose, eliminando a etapa de “Southern Blot” e assim diminuindo tempo de execução, custo e complexidade (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Teletchea, 2009). Marcadores do tipo PCR-RFLP são considerados eficientes na identificação e autenticação forense de espécies de peixes (Barker *et al.*, 1996; Innes *et al.*, 1998; Carrera *et al.*, 1999; Cocolin *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2000; Aranishi, 2005; Akasaki *et al.*, 2006; Finizio *et al.*, 2007).

Outra metodologia recentemente aplicada para a obtenção de marcadores moleculares é a técnica de PCR multiplex. Este método consiste na utilização de “primers” espécie-específicos para um determinado *locus*, o qual apresenta diferenças de uma a poucas substituições de nucleotídeos nas espécies a serem analisadas, de tal forma que mais de uma reação de PCR pode ser realizada simultaneamente (Henegariu *et al.*, 1997; Markoulatos *et al.*, 2002). Esta metodologia representa uma importante ferramenta na identificação de espécies, com aplicações em diversas áreas de estudo, como o monitoramento da qualidade de água (Abd-El-Haleem *et al.*, 2003), conservação genética (Chapman *et al.*, 2003;

Magnussen *et al.*, 2007; Apostolidis *et al.*, 2007) e identificação forense (Trotta *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2009).

Os marcadores do tipo PCR-RFLP e PCR multiplex são considerados baratos quando comparados a outras técnicas moleculares, exigirem pouco tempo de execução e permitirem a análise de um grande número de amostras simultaneamente (Teletchea, 2009). Recentemente, estas metodologias foram utilizadas com sucesso para uma rápida e precisa identificação de híbridos interespecíficos de peixes e seus parentais (Hashimoto *et al.*, 2009c).

Pode-se verificar, portanto, que os marcadores genéticos obtidos, tanto por meio de análises citogenéticas quanto por métodos moleculares, têm sido extensivamente utilizados na diferenciação de espécies de peixes e, mais recentemente, como uma ferramenta para a identificação e caracterização genética de espécies parentais e linhagens de híbridos naturais e artificiais. Ambas as metodologias têm suas indicações, vantagens e desvantagens, de acordo com o problema biológico em questão, sendo que o uso destes marcadores em conjunto pode proporcionar informações complementares, enriquecendo a análise e respondendo às questões de forma mais precisa. Desta maneira, tais estudos pretendem auxiliar na compreensão da dinâmica da hibridação interespecífica em peixes, fornecer subsídios para projetos que envolvam a técnica da hibridação e também contribuir em programas destinados à conservação biológica.

1.4 Considerações sobre as espécies parentais e seus híbridos

A ordem Siluriformes é um grupo de peixes que compreende 34 famílias, compostas por 412 gêneros e 2.405 espécies, das quais 1.300 habitam a região

Neotropical e o restante está distribuído nas regiões tropicais da África e Ásia (Nelson, 1994).

A principal característica externa das espécies pertencentes a esta ordem é a ausência de escamas, sendo os peixes revestidos por uma pele espessa ou então cobertos por placas ósseas, total ou parcialmente; são conhecidos como peixes de couro, cascudos, acarís, entre outros. Geralmente possuem três pares de barbilhões, nadadeiras dorsal e peitorais com um acúleo forte e pungente no primeiro raio e uma nadadeira adiposa (Britski *et al.*, 1984). Este acúleo pode infringir graves ferimentos e, em algumas espécies, injetar um veneno produzido por células glandulares no tecido epidérmico que cobre seus acúleos (Nelson, 1976).

As espécies de peixes deste grupo possuem hábitos sedentários, habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e vegetações, orientando-se principalmente através dos sentidos químicos, isto é, olfação e gustação (Britski *et al.*, 1984). São onívoros, com uma predileção especial por vermes, larvas de insetos e minhocas, ficando escondidos durante o dia e saindo à procura de alimentos a partir do anoitecer (Sterba, 1973).

Este grupo apresenta grande importância econômica por ser utilizado como fonte alimentar e possuir peixes com tamanhos bem variados, alguns com poucos centímetros (*Imparfinis mirini*) e outros chegando a mais de 2 metros de comprimento (*Sorubimichthys planiceps*) (Britski *et al.*, 1984). O maior número de espécies é encontrado na América do Sul, sendo muito comum nas águas doces do Brasil, sendo algumas espécies são encontradas na América Central, no Sul do México e nas Ilhas do Caribe (Nelson, 1976).

A família Pimelodidae é considerada um dos grupos mais importantes entre os Siluriformes Neotropicais, sendo atualmente formada por 29 gêneros e 93

espécies (Ferraris, 2007). Dentro desta família, destacam-se espécies notáveis pelo seu grande porte, como as espécies pertencentes aos gêneros *Brachyplatystoma* (piraíbas e douradas), *Pseudoplatystoma* (pintados e surubins) e *Zungaro* (jaú) (Britski, 1972). Espécies do gênero *Pseudoplatystoma* habitam exclusivamente regiões de água doce e são amplamente distribuídas pelas bacias hidrográficas da América do Sul (Buitrago-Suárez e Burr, 2007).

Até recentemente, apenas três espécies eram reconhecidas neste gênero: *Pseudoplatystoma corruscans*, popularmente conhecida como pintado ou sorubim, restrita às bacias do Prata e São Francisco; *Pseudoplatystoma fasciatum*, popularmente conhecida como cachara, amplamente distribuída pelas bacias do Prata, Amazônica, Orinoco, rio Magdalena e rios das Guianas; e *Pseudoplatystoma tigrinum*, também chamada de caparari ou pirambucu, nas bacias Amazônica e do Orinoco (Lundberg e Littmann, 2003). Contudo, estudos realizados por Buitrago-Suárez e Burr (2007), utilizando análises morfológicas, sugerem uma maior diversidade neste gênero, com 8 espécies reconhecidas. Segundo estes autores *P. tigrinum* passaria a ser denominada *P. metaense* nas bacias do Orinoco e *P. tigrinum* na bacia Amazônica. A espécie anteriormente identificada como *P. fasciatum* corresponderia a 5 espécies distintas: *P. fasciatum* na região das Guianas, *P. punctifer* na bacia Amazônica, *P. orinocoense* na bacia do Orinoco, *P. magdaleniatum* no rio Magdalena (Colômbia) e *P. reticulatum* nas bacias do Prata e Amazônica. Já *P. corruscans* continuaria com a mesma classificação, distribuída nas bacias do Prata e São Francisco.

P. corruscans e *P. reticulatum* são espécies migratórias de alto valor comercial e de grande importância na pesca das bacias em que ocorrem (Miranda, 1997). Seu valor econômico está principalmente relacionado com o fato de

possuírem grande porte e boa qualidade de carne, sem a presença de espinhos intramusculares (Inoue *et al.*, 2003). São também chamados de peixes “nobres”, uma vez que representam um troféu para os profissionais que praticam pesca esportiva.

Entretanto, a pesca excessiva destes animais, somada à degradação do ambiente natural por ações humanas, tem causado um impacto negativo nas suas populações naturais. Estudos têm mostrado que a cachara encontra-se em eminente ameaça de sobrepesca no Pantanal Matogrossense, necessitando de medidas para reduzir o esforço pesqueiro, ao passo que os estoques de pintado encontram-se aquém dos pontos estabelecidos como limites de exploração (Catella, 2004).

O cultivo destas espécies revelou um crescimento expressivo na última década, em parte devido à diminuição da sua captura na natureza, sendo que algumas pisciculturas nacionais têm realizado cruzamentos artificiais entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* produzindo híbridos interespecíficos que são considerados vantajosos comercialmente (Godinho, 2007; Porto-Foresti *et al.*, 2008). Estudos indicam que híbridos entre pintado e cachara não apresentam alterações morfológicas visíveis durante seu desenvolvimento embrionário (Faustino *et al.*, 2009), o que confirma o fato de serem viáveis tanto em cultivo quanto no ambiente natural.

Em cativeiro, estes híbridos são férteis (Senhorini, comunicação pessoal). Existem relatos da captura de indivíduos com características morfológicas intermediárias entre o pintado e cachara no rio Mogi-Guaçu (bacia do Alto Paraná), os quais possivelmente são híbridos resultantes de introduções ou escapes para a natureza (Senhorini, comunicação pessoal). Estes fatos, somados à escassez de estudos a respeito destes animais, confirmam os sérios riscos ecológicos e

genéticos que estes híbridos representam para as populações naturais de suas espécies parentais.

1.5 Estudos citogenéticos na família Pimelodidae (Siluriformes)

Estudos citogenéticos na família Pimelodidae têm revelado uma variação nos números diploides das espécies entre $2n=50$ e $2n=58$, sendo que a maioria das espécies apresenta $2n=56$ cromossomos (Swarça *et al.*, 2000; Lundberg e Littmann, 2003). LeGrande (1981) sugere que o número cromossômico ancestral dos Siluriformes seria de $2n=56 (\pm 2)$, de modo semelhante proposto por Oliveira e Gosztonyi (2000), onde $2n=56$ seria o número diploide basal nesta ordem de peixes. Porém, os representantes da família Pimelodidae apresentam grande variação nas fórmulas cariotípicas, possivelmente devido a rearranjos estruturais, responsáveis por mudanças internas nos cariótipos durante a história evolutiva do grupo, neste caso mantendo o número diploide, mas diversificando a morfologia cromossômica (Borin e Martins-Santos, 2004; Garcia e Moreira-Filho, 2005)

No gênero *Pseudoplatystoma* observa-se uma alta estabilidade no número de cromossomos, evidenciada pelo fato de que todas as espécies estudadas citogeneticamente até o momento (*P. corruscans*, *P. reticulatum* e *P. tigrinum*), possuem $2n=56$ cromossomos (Swarça *et al.*, 2000; Lundberg e Littmann, 2003). Porém, apresentam um número fundamental alto, com valores de 98 a 102, sendo que *P. corruscans* e *P. reticulatum* mostraram grande variação em suas fórmulas cariotípicas, de acordo com a distribuição geográfica das amostras analisadas (Bigoni *et al.*, 1992; Fenocchio e Bertollo, 1992; Souza *et al.*, 1997; Fenocchio, 1993; Martins-Santos *et al.*, 1996; Porto-Foresti *et al.*, 2000; Swarça *et al.* 2005; Foresti *et al.*, 2007).

A presença de sistemas de cromossomos sexuais diferenciados é pouco expressiva neste grupo, sendo descrita apenas para *Steindachneridion* sp, pertencente à família Pimelodidae, com sistemas sexuais simples do tipo XX:XY (Swarça *et al.*, 2006). O estudo de cromossomos supranumerários mostra resultados semelhantes, com ocorrência destes elementos genômicos apenas em *Bergiaria westermanni* (Dias e Foresti, 1993), *Iheringichthys labrosus* (Vissoto *et al.*, 1999) e espécies do gênero *Pimelodus* (Borin e Martins-Santos, 2004).

É característico dos representantes da família Pimelodidae e demais Siluriformes a pouca quantidade de heterocromatina constitutiva, que se encontra distribuída principalmente nas regiões terminais, centroméricas e/ou pericentroméricas dos cromossomos (Fenocchio e Bertollo, 1992; Souza *et al.*, 2004; Carvalho e Dias, 2005; Garcia e Moreira-Filho, 2005; Marques *et al.*, 2008). Os resultados do bandamento C em espécies de *Pseudoplatystoma* descritos por Bigoni *et al.* (1992), Fenocchio e Bertollo (1992), Martins-Santos *et al.* (1996), Porto-Foresti *et al.* (2000) e Swarça *et al.* (2005) mostraram o mesmo padrão de bandas heterocromáticas.

Os estudos de caracterização e localização da região organizadora de nucléolo (NOR) na família Pimelodidae indicam que é constante a presença de NOR simples na região terminal de um único par cromossômico. Todas as espécies de *Pseudoplatystoma* analisadas até o momento possuem NOR simples na região terminal do braço curto (Fenocchio e Bertollo, 1992; Souza *et al.*, 1997; Bigoni *et al.*, 1992; Porto-Foresti *et al.*, 2000). Oliveira e Gosztonyi (2000) argumentam que este tipo de NOR represente o estado ancestral para este caráter em Siluriformes.

A ocorrência de polimorfismos de tamanho desta região parece ser uma característica freqüente nesta família, como descrito para *Pimelodus* (Swarça *et al.*,

2001a; Garcia e Moreira-Filho, 2005), *Zungaro zungaro* (Swarça et al., 2001b), *Pirinampus pirinampu* (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000), *Steindachneridion scripta* (Swarça et al., 2008), *Iheringichthys labrosus* (Carvalho e Dias, 2007) e *P. corruscans* (Souza et al., 1997; Swarça et al., 2005). A utilização em conjunto das técnicas de coloração com nitrato de Prata, o fluorocromo CMA₃ e a técnica de FISH com sonda de DNAr 18S tem mostrado marcações correspondentes na maioria destas espécies (Swarça et al., 2001a, 2001b; Vidotto et al., 2004; Swarça et al., 2005; Garcia e Moreira-Filho, 2005; Swarça et al., 2008).

Dados citogenéticos referentes ao gene ribossômico 5S ainda são escassos em Pimelodidae, mas parecem demonstrar o predomínio de apenas um par cromossômico portador destes sítios ribossomais (Swarça et al., 2005; Carvalho e Dias, 2007). Entretanto, a ocorrência de mais de um par cromossômico portador destes genes foi observada em espécies do gênero *Pimelodus* (Garcia e Moreira-Filho, 2008).

1.6 Objetivos

Considerando que os estudos genéticos em híbridos interespecíficos de peixes ainda são escassos e, em sua maioria, não estão relacionados a projetos de cultivo, o presente projeto tem como objetivos principais:

- 1) identificar geneticamente, utilizando marcadores citogenéticos e genético-moleculares, espécies e estoques de peixes de interesse comercial que representam as linhagens parentais das espécies pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos que estão sendo atualmente produzidos em pisciculturas brasileiras;
- 2) estabelecer marcadores genéticos para possíveis diagnósticos que permitam a

identificação precisa de indivíduos e populações parentais, bem como das linhagens híbridas e que sejam adequados para o emprego prático, no manejo da hibridação em pisciculturas brasileiras;

3) promover a ordenação de dados biológicos de espécies e de linhagens híbridas que representem informações importantes para a piscicultura, com relação à dinâmica do processo de hibridação, tanto para fins comerciais como para fins de pesquisa básica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Tendo em vista o interesse de identificar geneticamente as espécies parentais pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos interespecíficos “pintachara” e “cachapinta” (Figura 1), foram coletados exemplares destas espécies dos estoques mantidos no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade (CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP), que também é o local onde os híbridos foram produzidos. Foram estudados ainda exemplares de *P. corruscans* capturados no rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná) e de *P. corruscans* e *P. reticulatum* capturados na região do Pantanal Sul Matogrossense, MS (bacia do rio Paraguai).

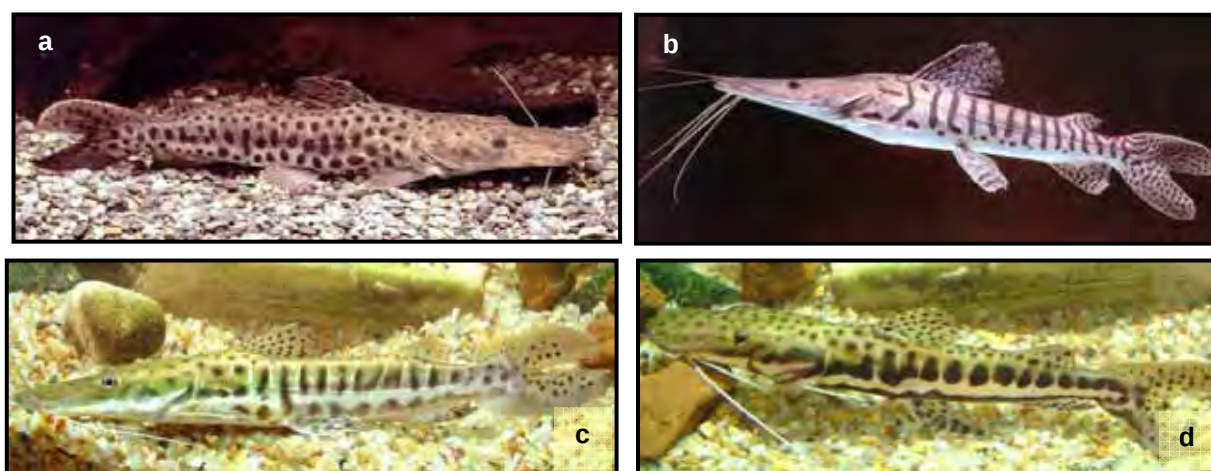


Figura 1 - Exemplar de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (a), de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (b), dos híbridos interespecíficos “pintachara” (c) e “cachapinta” (d).

O CEPTA/ICMBio é um Centro Especializado do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (Figura 2). Criado em 1979, seu objetivo é "contribuir para o uso

sustentável dos recursos ícticos tropicais, através da geração, adaptação e difusão de conhecimentos científicos, tecnológicos e ambientais em benefício da sociedade". Assim, o CEPTA realiza pesquisas sobre a biodiversidade dos recursos ícticos de águas continentais, que envolvem recursos genéticos; uso sustentável dos recursos pesqueiros (pesca e aquicultura); melhoria da qualidade ambiental; capacitação de recursos humanos e educação ambiental. O Centro tem como objetivo o estabelecimento de parcerias com instituições nacionais e internacionais, universidades, organizações não governamentais e com a iniciativa privada, buscando sempre a consecução de suas competências.



Figura 2 - Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais/Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (CEPTA/ICMBio) (Pirassununga, SP).

Os peixes coletados no CEPTA foram transportados para o laboratório a fim de realizar o processamento do material. Nas análises cromossômicas para a obtenção de cromossomos mitóticos, foram utilizados fragmentos de tecido da porção anterior do rim dos exemplares, segundo o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1981). Alguns animais analisados citogeneticamente foram identificados com marcadores magnéticos (tags) (Figuras 3a e 3b). De todos os animais analisados

citogeneticamente foram coletadas amostras de material biológico (fragmentos de fígado ou nadadeira, sangue) e preservados em etanol 95% para a realização das análises moleculares (Figura 3c). A seguir, os peixes foram numerados e registrados em caderno de campo. Por fim, os animais utilizados nos estudos genéticos foram fixados em formol 10%, conservados em etanol 70%, identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP, Campus de Bauru, SP.

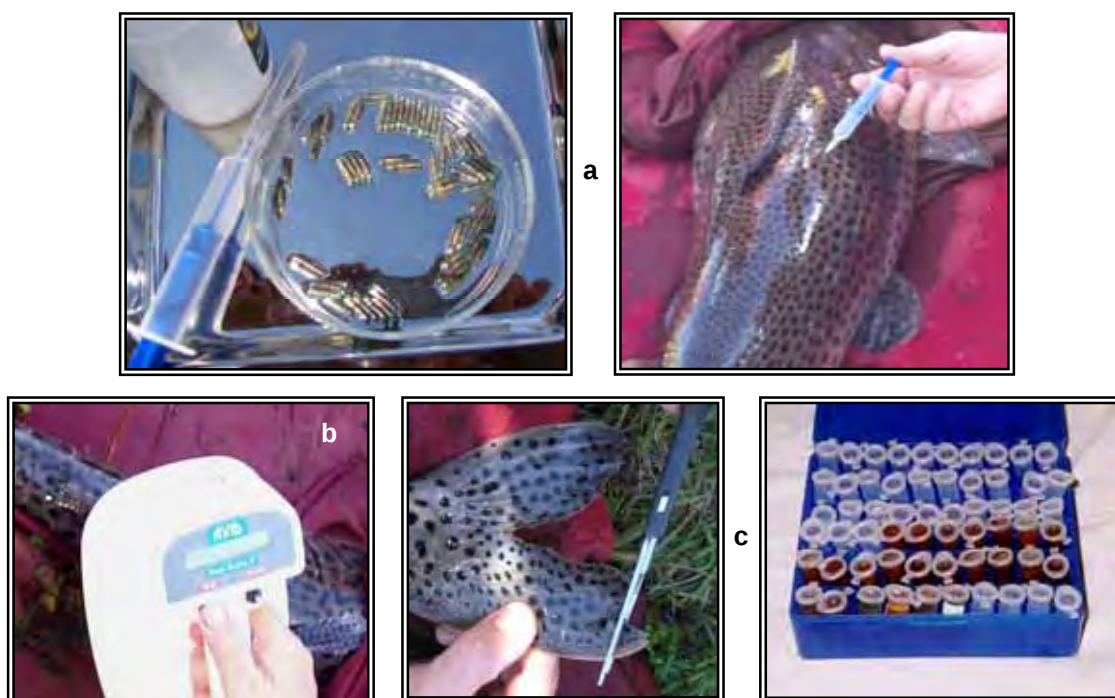


Figura 3 - Identificação de exemplares utilizando marcadores magnéticos (*tags*). (a) introdução de um pequeno *tag* na região dorsal do animal, perto da nadadeira, com o auxílio de uma seringa injetora que, ao ser pressionado o êmbolo, este desloca o *tag* para fora da agulha, introduzindo-o na musculatura do animal. Após a introdução do *tag* no animal, sempre que necessário este pode ser identificado com o auxílio de um equipamento leitor (b). Coleta de material para análises moleculares (c).

Na etapa do trabalho onde os exemplares do estoque de matrizes parentais do CEPTA/ICMBio foram identificados geneticamente e marcados com *tags*, tomou-se o cuidado para que os animais utilizados nas análises fossem representantes de gerações parentais provenientes de capturas na natureza e não decorrentes de

gerações sucessivas (F_1 , F_2 ,...) de criação em cativeiro, resultantes de programas de propagação por reprodução induzida nas instalações do CEPTA.

Em relação à linhagem parental, além das amostras de tecidos do CEPTA, também foram analisadas, através de técnicas moleculares, amostras de sangue e nadadeira de 25 exemplares de *Pseudoplatystoma corruscans* e 25 exemplares de *Pseudoplatystoma reticulatum* provenientes do rio Paraguai, MS (bacia do Paraguai), e de 21 exemplares de *P. corruscans* provenientes do Rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná).

Em uma primeira etapa de coleta no CEPTA, foram analisados citogeneticamente 22 exemplares de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e 19 exemplares de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (Tabela 1).

Tabela 1 - Propriedade, espécies de peixes estudadas citogeneticamente, número de exemplares analisados e marcados das espécies parentais utilizadas nos programas de hibridação.

Local de Coleta	Espécie	Número de exemplares	
		Analisados	Marcados
CEPTA/ICMBio Pirassununga/SP	Pintado – <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	22	30
	Cachara – <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	19	30

Na etapa seguinte iniciaram-se os processos de hibridação entre estas espécies nas dependências do CEPTA/ICMBio. Os cruzamentos dirigidos entre o pintado e o cachara produziram uma linhagem híbrida F_1 , constituída pelos híbridos “pintachara” (cruzamento interespecífico de fêmea de pintado com macho de cachara) e “cachapinta” (cruzamento interespecífico de fêmea de cachara com macho de pintado) (Figura 4).

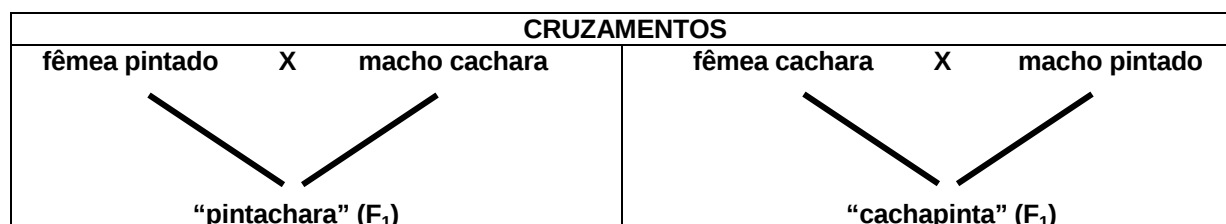


Figura 4 - Esquema dos cruzamentos envolvendo as espécies parentais, originando os híbridos F₁.

Foram analisados citogeneticamente 27 exemplares do híbrido interespecífico “pintachara” e 17 exemplares do híbrido interespecífico “cachapinta” (Tabela 2).

Tabela 2 - Propriedade, exemplares híbridos estudados, número de exemplares analisados e marcados.

Local de Coleta	Espécie	Número de exemplares	
		Analisados	Marcados
CEPTA/ICMBio Pirassununga/SP	“pintachara” (fêmea do pintado X macho da cachara)	27	30
	“cachapinta” (fêmea da cachara X macho do pintado)	17	30

2.2 Métodos

2.2.1 Métodos citogenéticos

Na análise citogenética das amostras foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Lozano *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981), coloração das regiões organizadoras de nucléolo (NOR) com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980), caracterização dos padrões de heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972), detecção de regiões cromossômicas ricas em pares de bases GC com a técnica que emprega o corante Cromomicina A₃ (CMA₃) (Schweizer, 1976) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Porto-Foresti *et al.*, 2002), com sondas de DNA ribossômico

(DNAr) 18S e 5S. Para montagem dos cariótipos, utilizou-se a técnica descrita por Levan *et al.* (1964) e Porto Foresti *et al.* (2008). A marcação dos exemplares seguiu o procedimento descrito por Porto-Foresti (2001). Algumas adaptações foram realizadas nessas técnicas, ajustando-as para as espécies estudadas.

2.2.1.1 Estimulação de mitoses

Para obtenção de maior número de mitoses nas preparações cromossômicas foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular por injeção de solução de fermento biológico nos exemplares, descrita inicialmente por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder (1980) para pequenos mamíferos e por Lozano *et al.* (1988) e Oliveira *et al.* (1988) para peixes. O procedimento utilizado consiste em:

- 1** preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2** incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min;
- 3** injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal. A injeção da quantidade total é realizada em duas doses, dividida e aplicada no período de 48 h;
- 4** manter o animal em aquário bem aerado.

2.2.1.2 Obtenção de cromossomos mitóticos de peixes (técnica in vivo)

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos de peixes *in vivo* foi a descrita por Foresti *et al.* (1981) e utilizada com algumas adaptações. O procedimento consiste em:

- 1** injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 0,5 ml / 100 g de peso do animal;
- 2** deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 min;
- 3** sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCL (0,075M);
- 4** dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até que se obtenha uma solução aquosa homogênea;
- 5** transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e depositar este no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;
- 6** retirar o tubo da estufa, colocando 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1 respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 7** adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;
- 8** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a 900 ± 100 rpm;
- 9** repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação e lavagem das células em suspensão;
- 10** pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar;
- 11** as lâminas foram guardadas no congelador, mantendo-se conservadas para a aplicação de técnicas de bandamento cromossômico.

2.2.1.3 Detecção da região organizadora de nucléolo (Ag-NOR)

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água destilada. Acrescentam-se 0,5 ml de ácido fórmico.
- Solução B (solução de nitrato de Prata): 1 g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das NOR é o seguinte:

- 1** hidrolisar o material contido nas lâminas por 3 min em HCl 1N a 60°C;
- 2** secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;
- 3** deixar as lâminas sobre um suporte no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3), a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lavar a lâmina em água destilada, retirando a lamínula e deixar secar;
- 4** corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 seg;
- 5** deixar secar ao ar.

2.2.1.4 Caracterização da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972) com algumas adaptações, que consiste em:

- 1** hidrolisar o material contido nas lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente e posteriormente lavar com água destilada;

- 2 passar por uma solução de BaOH_2 a 5% por cerca de 7 segundos e posteriormente lavar com água destilada;
- 3 banhar em HCl 1N a 60°C e então lavar novamente com água destilada;
- 4 incubar por 20 minutos em 2xSSC ($\text{pH}=6,8$) a 60°C e lavar com água destilada;
- 5 corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 7,5% em tampão fosfato ($\text{pH}=6,7$).

2.2.1.5 Bandamento com o fluorocromo cromomicina A_3 (CMA_3)

O procedimento utilizado para a detecção de regiões ricas em pares de bases GC seguiu a técnica descrita por Schweizer (1976), com algumas adaptações.

- 1 Colocar as lâminas em cubetas e imergi-lás com uma solução de tampão McIlvaine + MgCl_2 à temperatura ambiente por 10 minutos;
- 2 Agitar as lâminas e secar o lado de trás. Colocar 20 μl de CMA_3 (0,5mg/ml) por gota de preparação, cobrir com lamínulas e deixar o conjunto em caixa escura por 15 minutos à temperatura ambiente;
- 3 Retirar as lamínulas em tampão McIlvaine lavando as lâminas vagarosamente nessa solução;
- 4 Incubar as lâminas em solução de Methyl-green/Hepes por 15 minutos;
- 5 Lavar as lâminas em solução de Hepes/ NaCl ;
- 6 Secar as lâminas, pingar uma solução de glicerol com propilgalato e colocar lamínula para montagem das lâminas permanentes;
- 7 Deixar as lâminas no escuro e na geladeira por pelo menos 30 dias antes de analisar e fotografar em microscopia de fluorescência.

2.2.1.6 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr

2.2.1.6.1 Obtenção das sondas

Para realização da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes foram obtidas duas sequências de DNA ribossômico (DNAr) (18S DNAr e 5S DNAr). A sonda de DNAr 18S foi obtida de *Oreochromis niloticus*, preparada e cedida pelo Dr. Cláudio de Oliveira, enquanto a sonda de DNAr 5S foi obtida através da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se os *primers Forward* (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e *Reverse* (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'), conforme descrito por Pendás *et al.* (1994). Inicialmente, o DNA foi marcado com biotina-dATP ou digoxigenina-dUTP pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Bionick™ Labelling System-Gibco.BRL). Após as marcações, procedeu-se à técnica de hibridização utilizada por Porto-Foresti *et al.* (2002) e as lâminas foram contracoradas com Iodeto de Propídeo ou DAPI.

2.2.1.6.2 Marcação do DNA pela técnica de *nick translation*

Inicialmente, o DNA foi marcado com biotina-dATP ou digoxigenina-dUTP pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Bionick™ Labelling System-Gibco.BRL). Após a marcação das sondas, procedeu-se a técnica de hibridação descrita por Porto-Foresti *et al.* (2002), com algumas adaptações.

Para marcação com biotina-dATP ou digoxigenina-dUTP, foi seguido o seguinte protocolo:

1 em um tubo de 0,5 ml preparar uma solução contendo 5 µl de uma solução de 10X dNTP (contendo 0,1 mM de biotina-dATP ou digoxigenina dUTP), 5 µl de uma solução tamponada de enzimas (0,0075 unidades/ µl de DNase I e 0,5 unidades/ µl

de DNA polimerase I), 1 µg de DNA (gene de interesse 18S ou 5S) e água para um volume final de 45 µl. Misturar a solução em um vórtex e centrifugar brevemente a 14.000 rpm;

2 incubar a 16°C por 1 hora.

3 adicionar 5 µl de um tampão de bloqueio (*stop buffer*).

4 adicionar 5 µl de uma solução a 3M de acetato de sódio e 120 µl de etanol absoluto gelado (-20°C). Misturar os componentes invertendo várias vezes o tubo contendo a mistura e incubar a -70°C por 30 minutos ou -20°C por 2 horas;

5 centrifugar a 14.000 rpm por 10 min. Remover e descartar o sobrenadante;

6 ressuspender o DNA em 500 µl de etanol a 75% gelado (-20°C). Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos. Remover o sobrenadante e secar o DNA a temperatura ambiente;

7 adicionar 20 µl de uma solução de hibridação (50% formamida deionizada, 10% dextran sulfate, 2XSSC e 20 mg/ml de albumina fetal bovina). Estocar o DNA a -20°C.

2.2.1.6.3 Hibridação

1 Incubar as lâminas em uma solução contendo 200 µl de 2XSSC (pH=7,0) e 2 µl de RNase (100 mg/ml) em uma câmara úmida a 37°C por 1 hora;

2 em um *coplin* de vidro, preparar 40 ml de uma solução de desnaturação (70% Formamida, 2XSSC) e aquecer a 72°C em um banho-maria. Colocar as lâminas na solução de desnaturação e incubar por 2 a 3 minutos;

3 desidratar as lâminas em banhos sucessivos em etanol a 70%, 85% e 100% a -20°C por 3 minutos cada. Deixar as lâminas secando ao ar;

4 desnaturar as sondas incubando-as em um banho-maria a 72°C por 5 minutos;

- 5** colocar 7,5 µl da solução com as sondas + 7,5 µl de solução de hibridação em cada gota de preparação e cobrir com lamínula (no caso do “double FISH” coloca-se as duas sondas juntas na lâmina a ser hibridizada, em iguais concentrações)
- 6** incubar as lâminas a 37°C por cerca de 15 horas (*over night*) em uma câmara úmida;
- 7** remover as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de 50% formamida/2XSSC por 10 minutos cada. Nesse passo, a estringência da reação pode ser aumentada ou diminuída, na mesma proporção em que a concentração de formamida for maior ou menor, respectivamente;
- 8** lavar as lâminas duas vezes em 2XSSC por 10 minutos a 42°C;
- 9** secar as lâminas e aplicar, em cada gota de preparação celular, 15 µl do reagente de detecção (avidina marcada com fluoresceína ou digoxigenina marcada com rodamina) e cobrir com uma lamínula.
- 10** Incubar as lâminas a 37°C por 15 a 60 minutos em uma câmara úmida;
- 11** remover as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de PBD (PBS com 1% de Triton X-100) por 5 minutos a temperatura ambiente;
- 12** lavar as lâminas em uma solução de PBS (tampão fosfato) por 5 minutos a temperatura ambiente;

Para as sequências com um número grande de cópias, como as sequências de DNAr 18S e 5S estudadas, procedeu-se diretamente com a contra-coloração (utilizou-se os corantes Iodeto de propídeo ou DAPI) e análise em fotomicroscópio de fluorescência.

2.2.2 Estudos Cariotípicos

A partir dos dados obtidos pelas análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases em cada indivíduo estudado, procurou-se estabelecer um número diploide modal para os exemplares de cada espécie. Assim, as melhores metáfases ou as que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas em fotomicroscópio da marca OLYMPUS, modelo BX50, com objetiva de imersão de 100X. O filme utilizado foi o AGFA HDP e as cópias dos negativos foram feitas em papel fotográfico Kodabromide F3.

Para a técnica de Cromomicina A₃ (CMA₃) e FISH, foram utilizados filtros de fluorescência com objetiva de imersão e as preparações cromossômicas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus, modelo BX50, equipado com Epi-Fluorescência.

2.2.3 Montagem dos Cariótipos

Os cromossomos recortados e dispostos em cartolina com fita adesiva, foram inicialmente arranjados de acordo com seu tamanho e morfologia, sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), emparelhados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho para a organização final do cariótipo, conforme descrito por Levan *et al.* (1964). O cariótipo dos híbridos foi organizado de acordo com Porto-Foresti *et al.* (2008).

2.2.4 Marcação dos Exemplares

Tendo em vista a realização de um trabalho de caracterização genética dos indivíduos utilizados como reprodutores, exemplares das espécies parentais e

híbridos foram marcados com *tags* e mantidos vivos em tanques, nas dependências do CEPTA. Os *tags* são pequenos bastonetes de metal magnetizados, que apresentam sistema de identificação semelhante ao código de barras, correntemente empregado para identificação de diversos produtos.

O procedimento de marcação dos exemplares segue o descrito por Porto-Foresti (2001):

- 1** anestesiar o animal em uma solução de 2 g de anestésico (benzocaína) em 20 L de água;
- 2** introduzir o *tag* na região lombar esquerda, perto da nadadeira dorsal do animal, com o auxílio de uma seringa injetora;
- 3** pressionar o êmbolo, que desloca o *tag* para fora da agulha, introduzindo-o na musculatura do animal;
- 4** após a introdução do *tag* no animal, sempre que necessário este pode ser identificado com o auxílio de um equipamento leitor. A identificação é feita passando-se o leitor sobre a região onde foi introduzido o *tag* e a leitura é feita diretamente no mostrador;

No caso da morte do animal ou na desativação do experimento, os *tags* podem ser recuperados para serem reutilizados após sua limpeza. Este procedimento é realizado retirando-se o *tag* do animal, esterilizando-o em álcool 70% e colocando-o novamente na seringa injetora.

2.2.5 Métodos moleculares

Para as análises moleculares foram utilizados os métodos de extração e purificação do DNA total baseados no kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega”. Em seguida, foram amplificadas e seqüenciadas regiões

do gene mitocondrial 16S e do gene nuclear RAG2 de 3 exemplares de cada espécie parental. A partir do alinhamento das seqüências pelo programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), encontraram-se alguns sítios polimórficos espécie-específicos para o uso das técnicas de PCR-RFLP e PCR multiplex. A primeira foi baseada em mapas de restrição gerados pelo programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003), enquanto na segunda foram desenhados *primers* espécies-específicos com auxílio do programa *NetPrimer* disponível no site <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>>.

2.2.5.1 Extração e purificação de DNA

Foram utilizados dois protocolos de extração de DNA (protocolos A e B), tendo por base o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas diferenças de acordo com o tecido utilizado. O protocolo A foi empregado para extração de DNA de sangue, enquanto o protocolo B foi utilizado para amostras de tecidos sólidos como fígado e nadadeira. O DNA genômico total extraído foi quantificado em gel de agarose 1% através da comparação com o padrão do *ladder* “Low DNA Mass Ladder – Invitrogen”, que possui peso molecular e concentrações conhecidos.

Protocolo A

- 1 numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml);
- 2 retirar uma pequena quantidade de sangue, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3 adicionar 300 µl de “Cell Lysis Solution”;
- 4 adicionar 5 µl de “Proteinase K” e vortexar;

- 5** levar ao banho-maria a 55° C por aproximadamente 1 hora; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6** centrifugar por 30 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 7** vortexar o pellet e adicionar 300 µl de “Nuclei lysis solution” e vortexar por 20 segundos;
- 8** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 9** transferir o sobrenadante para a segunda série de tubo de microcentrífuga contendo 300 µl de Isopropanol e misturar por inversão;
- 10** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 11** adicionar 300 µl de Etanol 70% a temperatura ambiente;
- 12** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 13** descartar o etanol cuidadosamente virando o tubo;
- 14** deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37° C, por 1 hora;
- 15** adicionar 100 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65° C ou 24 horas a 4° C.

Protocolo B

- 1** numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml);
- 2** retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3** adicionar 600 µl de “Cell Lysis Solution”;
- 4** adicionar 5 µl de “Proteinase K” e vortexar;
- 5** levar ao banho-maria a 60° C por aproximadamente 2 horas; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6** adicionar 3 µl de “RNase” e colocar no banho-maria a 37° C por 30 minutos. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;

- 7** adicionar 200 µl de “Protein Precipitation Solution” e misturar rapidamente no vórtex;
- 8** Levar ao gelo por 5 minutos;
- 9** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 10** remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente;
- 11** inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA tornem-se visíveis;
- 12** centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente;
- 13** adicionar 600 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo). Não é necessário homogeneizar a amostra;
- 14** centrifugar por 4 minutos a 13000 rpm;
- 15** deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, por 1 hora;
- 16** adicionar 75 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65° C ou 24 horas a 4°C.

2.2.5.2 Amplificação do gene nuclear RAG2 e mitocondrial 16S

O isolamento e amplificação de uma região do gene nuclear RAG2 e do gene mitocondrial 16S foi realizado com a aplicação da técnica de PCR, utilizando-se os *primers* RAG2 F (5'- CCTGAGTGCTACCTTATTCATGGA-3') e RAG2 R (5'- CTTGGGAGGAAGAGACCATC-3'), desenhados a partir da sequência depositada no Genbank (Número de acesso DQ492364) da espécie *Phractocephalus hemioliopterus*, e 16S F (5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16S R (5'-CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'), como descrito por Palumbi (1996). As amplificações de ambos os genes foram realizadas basicamente em um volume total

de 25 µl contendo 150 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50 mM KCl), 0.5 unidades (U) de *Taq Polymerase* (Invitrogen), 0.1 a 0,2 µM de cada *primer* e 10-50 ng de DNA genômico. Estas reações foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf), basicamente sob as condições de desnaturação a 95°C por 30s, hibridização a 52°C por 40s e extensão a 72°C por 1 5s, com 35 repetições.

2.2.5.3 Purificação dos produtos amplificados por PCR

Foi utilizado o protocolo de purificação de DNA tendo por base o kit comercial Protocolo do PEG (PolyEthylene Glycol) desenvolvido por Travis Glenn, disponível no endereço <http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf>:

- 1** adicionar 25 µl de polietileno glicol (PEG) 20%-NaCl 2,5 M ao produto de PCR amplificado (25 µl). Misturar com a pipeta várias vezes;
- 2** colocar a 37°C em estufa ou termociclador por 15 minutos;
- 3** centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente;
- 4** descartar o sobrenadante;
- 5** adicionar 63 µl de álcool etílico 80% e esperar 2 minutos;
- 6** centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
- 7** descartar o sobrenadante;
- 8** adicionar 63 µl de álcool etílico 80% e esperar 2 minutos;
- 9** centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
- 10** descartar o sobrenadante;
- 11** secar em estufa a 37°C por cerca de 10 minutos;
- 12** eluir em TE (100 mM Tris-CL e 10 mM EDTA - pH 8.0) adicionando 12,5µl e aguardar pelo menos 30 minutos antes de utilizar o produto limpo.

2.2.5.4 Reação de amplificação para o seqüenciamento

Os produtos amplificados e purificados foram utilizados como moldes para as reações de seqüenciamento com o kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences), utilizando o *primer Forward* para cada gene. Para cada seqüência gênica realizou-se uma réplica. A reação de seqüenciamento seguiu os seguintes parâmetros: um ciclo inicial a 95°C por 2 min, e 25 ciclos de 95°C/45s, 50°C/30s e 60°C/2min. Em cada reação foram utilizados 3 µl de produto da PCR, 2 µl de tampão da reação (buffer), 2 µl de pré-mix e 2 µl do *primer Forward* (3 µM).

2.2.5.5 Limpeza dos fragmentos marcados

Na limpeza dos fragmentos resultantes do processo de amplificação procedeu-se do seguinte modo:

- 1** adicionar 1,0 µl de acetato de sódio 1,5M/EDTA 250 mM a cada tubo;
- 2** adicionar 80 µl de etanol 95% para cada reação e misturar no vórtex;
- 3** centrifugar a 16.000 rpm por 20 minutos a 4°C;
- 4** remover o sobrenadante por aspiração;
- 5** adicionar 400 µl de etanol 70%;
- 6** centrifugar a 16.000 rpm por 10 minutos a 4°C;
- 7** remover o sobrenadante por aspiração;
- 8** deixar secar na estufa a 37°C por 30 minutos, protegido da luz.

As seqüências foram determinadas no seqüenciador automático ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer) e posteriormente serão depositadas no GenBank do National Center of Biotechnology Information (NCBI), vinculado ao National Institute of Health (NIH).

2.2.5.6 Análises de PCR-RFLP

As regiões seqüenciadas foram submetidas ao programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) para gerar mapas de restrição, tornando possível encontrar enzimas específicas para as espécies parentais analisadas. Amplificações de PCR, de acordo com o item 2.2.11, foram submetidas à restrição enzimática em um volume final de 8 µl contendo 5 µl dos produtos de PCR, tampão da enzima 1X e 5 unidades da enzima de restrição (10 U/µl) (New England Biolabs Inc). O material das reações foi incubado por 2 horas de acordo com a temperatura ideal de cada enzima

2.2.5.7 Análises de PCR multiplex

As seqüências parciais dos genes foram alinhadas através do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa BIOEDIT (Hall, 1999) para verificar pontos de mutação, a partir dos quais foram desenhados os *primers* espécie-específicos. As condições ideais dos *primers* foram analisadas através do programa NetPrimer disponível no site do PREMIER Biosoft International <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>>. As concentrações dos reagentes utilizados na amplificação multiplex, assim como as condições da PCR foram mantidas basicamente como descritas no item 2.2.11.

Os fragmentos de DNA das análises PCR-RFLP e PCR-multiplex foram aplicados em um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (1 ng/ml), visualizados em luz ultravioleta e capturados pela câmera digital OLYMPUS (CAMEDIA - C-5060 5.1 Megapixel).

3 RESULTADOS

Os resultados e a discussão dos dados obtidos nas análises citogenéticas e moleculares encontram-se apresentados na forma de capítulos, referentes aos tópicos abordados. As citações bibliográficas referentes a cada capítulo estão discriminadas no item Referências, visando otimizar a apresentação da dissertação.

3.1 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO CITOGÉNÉTICA DE *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma reticulatum* (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) E SEUS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS.

3.2 CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS HÍBRIDOS ENTRE OS BAGRES NEOTROPICAIS *Pseudoplatystoma corruscans* E *Pseudoplatystoma reticulatum* (SILURIFORMES, PIMELODIDAE).

3.3 CAPÍTULO 3 – OCORRÊNCIA DE HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E *Pseudoplatystoma reticulatum* NOS RIOS PARAGUAI (BACIA DO PARAGUAI) E MOGI-GUAÇU (BACIA DO ALTO PARANÁ), BRASIL: EVIDÊNCIAS DE CONTAMINAÇÃO GENÉTICA DO AMBIENTE NATURAL.

CAPÍTULO 1

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Pseudoplatystoma corruscans*,
Pseudoplatystoma reticulatum (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) E SEUS
HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS.**

RESUMO

Exemplares de *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma reticulatum* e seus híbridos interespecíficos foram analisados citogeneticamente através de diversos tipos de bandamentos cromossômicos. Os resultados obtidos mostraram o número diploide de $2n=56$ organizados em um cariótipo de $20m+12sm+12st+12a$ (NF=100) e um padrão de bandas heterocromáticas nas porções pericentroméricas e terminais de alguns cromossomos do complemento para todos os parentais e híbridos analisados. As regiões organizadoras de nucléolo apresentaram-se na região terminal do par cromossômico 18 em *P. corruscans* e *P. reticulatum*. Os híbridos mostraram NOR em dois cromossomos subtelocêntricos de igual tamanho e morfologia. A análise desta região nos híbridos e parentais, através de cromomicina e FISH com sondas de DNA ribossômico 18S indicou a ocorrência de dois cromossomos marcados correspondentes à NOR. Os genes ribossômicos 5S estavam situados na região pericentromérica de dois cromossomos subtelocêntricos distintos dos cromossomos da NOR nos parentais e híbridos. Verificou-se alta similaridade cromossômica entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*, o que pode estar relacionado com a fertilidade de seus híbridos interespecíficos. Estes resultados permitiram uma discussão sobre as características citogenéticas das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*, pertencentes à família Pimelodidae, assim como um esclarecimento sobre alguns processos cromossômicos que envolvem a hibridação entre estas espécies.

Palavras chave: *Pseudoplatystoma*; Hibridação interespecífica; Bandamentos cromossômicos.

INTRODUÇÃO

A hibridação interespecífica artificial é uma técnica de manipulação genética que tem sido utilizada em programas de cultivo de peixes a fim de obter indivíduos estéreis e com características zootécnicas vantajosas em relação às espécies parentais (Bartley *et al.*, 2001). Porém, existem riscos decorrentes desta técnica de melhoramento animal, que vão desde a contaminação de estoques cultivados e naturais até a perda da integridade genética ou extinção das espécies nativas puras (Huxel, 1999; Epifanio e Philipp, 2001).

Uma das principais etapas que deveriam ser realizadas em pisciculturas que produzem híbridos interespecíficos é a identificação genética destes animais (Toledo-Filho *et al.*, 1998; Porto-Foresti e Foresti, 2004). Entre as diversas técnicas disponíveis para o estudo da hibridação, a citogenética é uma importante ferramenta para a identificação dos níveis de ploidia e análise da morfologia e estrutura cromossômica de espécies parentais e híbridos, assim como na obtenção de marcadores cromossômicos que os identifique e diferencie (Toledo-Filho *et al.*, 1994; Porto-Foresti *et al.*, 2008).

Atualmente, algumas pisciculturas brasileiras têm produzido híbridos entre *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (cachara), os quais são considerados vantajosos comercialmente (Godinho, 2007; Porto-Foresti *et al.*, 2008). Até o presente momento, existem poucas informações na literatura a respeito destes híbridos e sobre quais seriam os impactos genéticos e ecológicos da produção destes animais em relação a suas espécies parentais.

Como a hibridação entre diferentes espécies de peixes se tornou uma prática comum, o objetivo deste trabalho foi identificar citogeneticamente, através de diferentes tipos de bandamentos cromossômicos, os parentais *P. corruscans*, *P. reticulatum* e seus híbridos interespecíficos.

MATERIAL E MÉTODOS

Em relação à linhagem parental, 22 exemplares de *P. corruscans* e 19 exemplares de *P. reticulatum* foram analisados citogeneticamente. Os cruzamentos entre estas espécies deram origem aos híbridos “pintachara” (cruzamento entre fêmea de pintado e macho de cachara) e “cachapinta” (cruzamento entre fêmea de cachara e macho de pintado). Foi analisado citogeneticamente um total de 44 exemplares híbridos, onde 27 foram do tipo híbrido “pintachara” e 17 “cachapinta”.

Todos os exemplares estudados foram obtidos do estoque de cultivo pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade (CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP), que também é o local onde os híbridos foram produzidos. Membros do estoque parental de *P. corruscans* foram capturados no rio Mogi Guaçu (bacia do Alto Paraná) enquanto exemplares de *P. reticulatum* foram capturados na região do Pantanal Sul Matogrossense (bacia do Paraguai), porém este centro de pesquisa não disponibilizou informações acuradas a respeito da procedência destas espécies. Os peixes foram identificados e estocados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes, UNESP, Bauru (SP).

Para a obtenção de cromossomos mitóticos foram utilizadas as técnicas de estimulação de mitoses através da injeção de solução de fermento biológico

(Oliveira *et al.*, 1988; Lozano *et al.*, 1988) e obtenção de preparações cromossômicas *in vivo* através de suspensão de células renais (Foresti *et al.*, 1981). Para a caracterização da heterocromatina constitutiva (banda C), foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972). A região organizadora de nucléolos (NOR) foi identificada através da coloração com nitrato de Prata (Howell e Black, 1980), coloração com o fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃) (Schweizer, 1976) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA ribossômico (DNAr) 18S e 5S (Porto-Foresti *et al.*, 2002).

A sonda de DNAr 18S foi obtida de *Oreochromis niloticus*, preparada e cedida pelo Dr. Cláudio de Oliveira, enquanto a sonda de DNAr 5S foi obtida através da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se os *primers Forward* (5'-TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e *Reverse* (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') conforme descrito por Pendás *et al.* (1994). Inicialmente, o DNA foi marcado com biotina-dATP ou digoxigenina-dUTP pela técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Bionick™ Labelling System-Gibco.BRL). Após as marcações, procedeu-se a técnica de hibridização utilizada por Porto-Foresti *et al.* (2002) e as lâminas foram contracoradas com Iodeto de Propídeo ou DAPI.

As metáfases foram capturadas através de fotomicroscópio Olympus, modelo BX50, equipado com Epi-Fluorescência. Os cromossomos das espécies parentais e híbridos foram classificados de acordo com seu tamanho e morfologia, em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) conforme descrito por Levan *et al.* (1964). O cariótipo dos híbridos foi organizado de acordo com Porto-Foresti *et al.* (2008).

RESULTADOS

Espécies parentais

Os parentais *P. corruscans* e *P. reticulatum* apresentaram o número diploide de $2n=56$ cromossomos distribuídos em um cariótipo de $20m+12sm+12st+12a$ e número fundamental (NF) igual a 100 (Figura 1). Após a coloração com nitrato de Prata, estas duas espécies mostraram NOR na região terminal do braço curto do par subtelocêntrico 18, apresentando polimorfismos de tamanho em algumas metáfases analisadas (Figura 1).

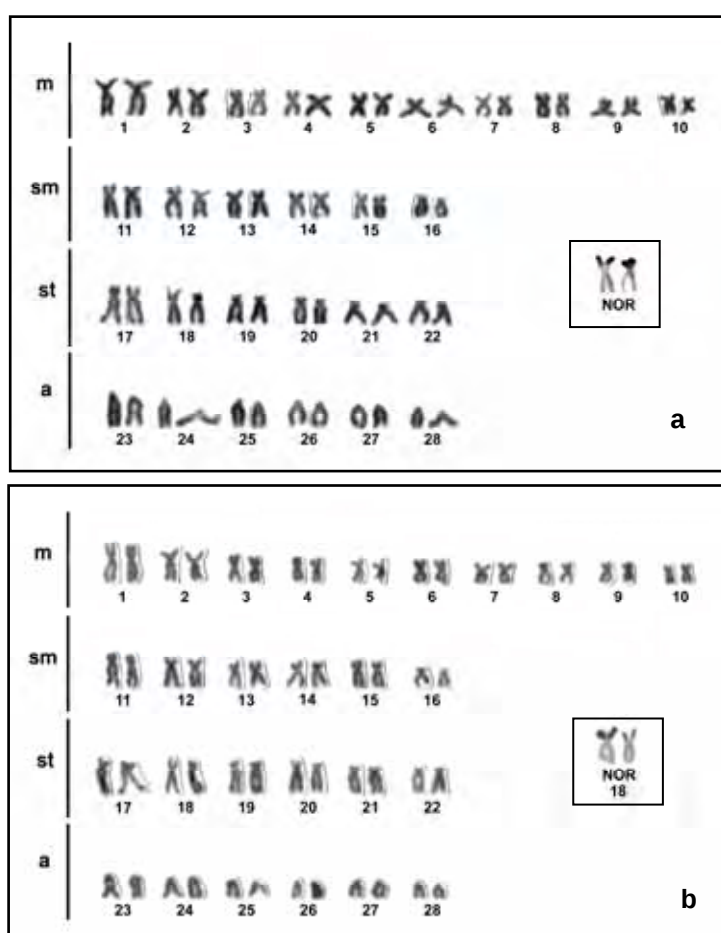


Figura 1 - Cariótipos de *P. corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b) após coloração com Giemsa. Em destaque o par cromossômico portador da NOR após a coloração com nitrato de Prata.

O bandamento C revelou blocos de heterocromatina constitutiva nas porções terminais e pericentroméricas de alguns cromossomos, tanto para *P. corruscans* como para *P. reticulatum* (Figura 2).

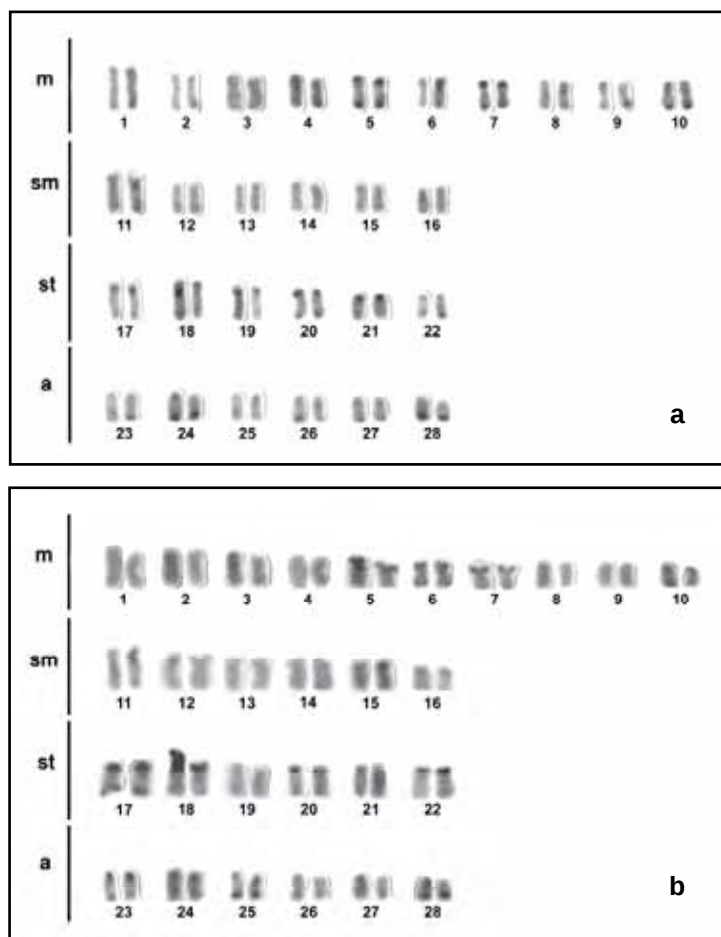


Figura 2 - Cariótipos de *P. corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b) após o bandamento C.

A coloração com o fluorocromo CMA₃ e a FISH com sonda de DNAr 18S nos cromossomos das espécies parentais mostraram marcações no mesmo local do par cromossômico portador da NOR e apresentando diferenças de tamanho entre os cromossomos homólogos (Figura 3), enquanto os genes ribossômicos 5S foram visualizados, através da FISH, na região pericentromérica de um par subtelocêntrico diferente do par portador da NOR (Figura 4).

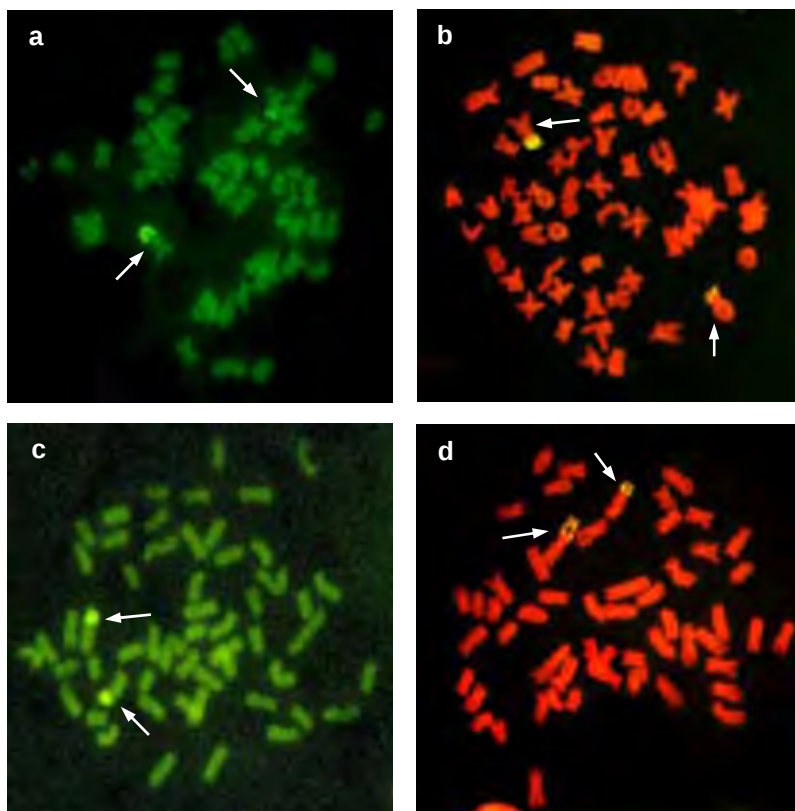


Figura 3 – Metáfases de *P. corruscans* (a, b) e *P. reticulatum* (c, d) após a coloração com o fluorocromo cromomicina CMA₃ (a, c) e FISH com sonda de DNAr 18S (b, d). As setas indicam os cromossomos marcados.

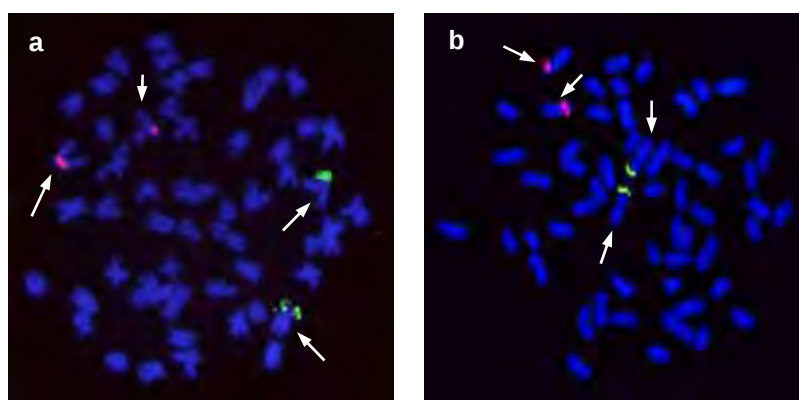


Figura 4 – Metáfases de *P. corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b) após o double FISH com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde). As setas indicam os cromossomos marcados.

Híbridos interespecíficos

Os híbridos “pintachara” e “cachapinta” apresentaram o número diploide de $2n=56$ cromossomos e um cariótipo formado por $20m+12sm+12st+12a$ e $NF=100$ (Figura 5). A NOR foi localizada na porção terminal do braço curto de dois cromossomos subtelocêntricos, localizados no cariótipo em região correspondente ao par 18 observado nos parentais, e apresentando polimorfismos de tamanho em algumas metáfases (Figura 5).

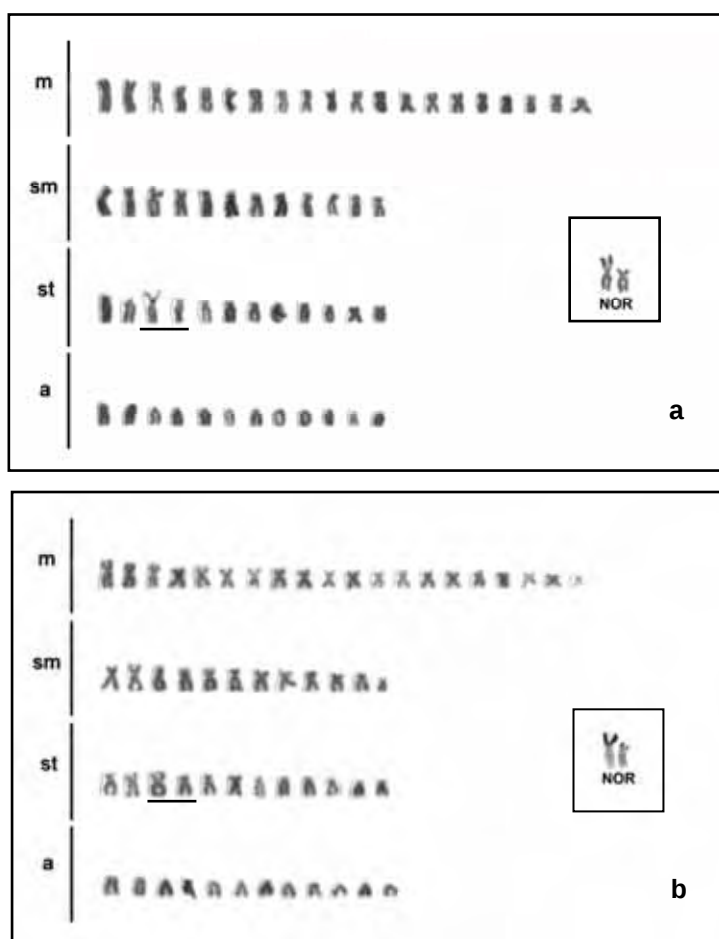


Figura 5 - Cariótipos dos híbridos interespecíficos “pintachara” (a) e “cachapinta” (b) após coloração com Giemsa. Em destaque os cromossomos portadores da NOR após a coloração com nitrato de Prata.

O bandamento C revelou bandas heterocromáticas terminais e pericentroméricas em alguns cromossomos em ambos os híbridos interespecíficos (Figura 6).

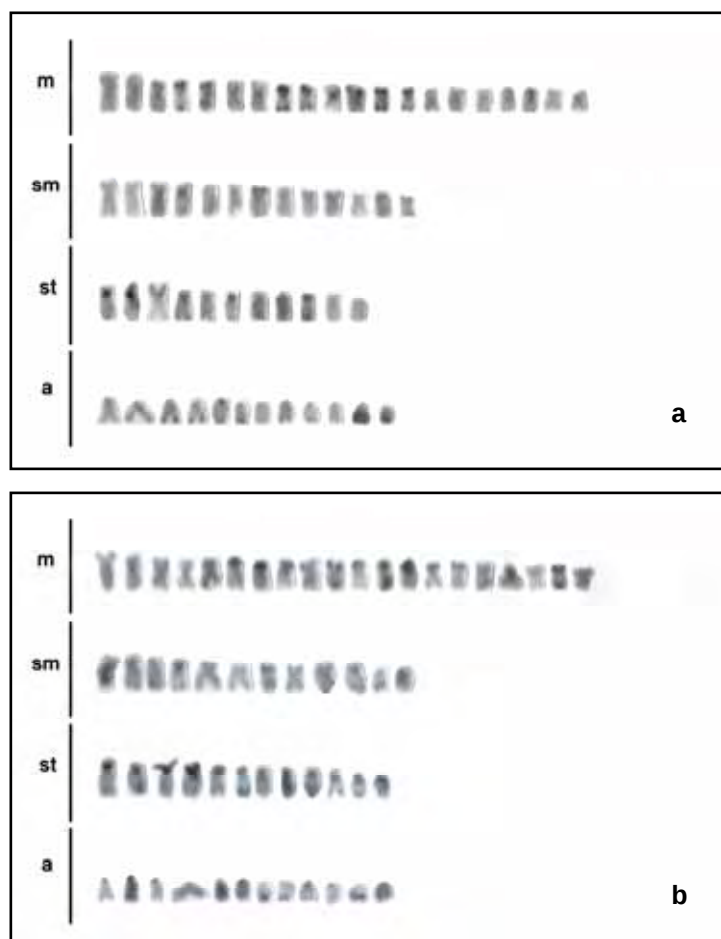


Figura 6 - Cariótipos dos híbridos interespecíficos “pintachara” (a) e “cachapinta” (b) após o bandamento C.

Adicionalmente, a coloração com nitrato de prata revelou uma variação quanto aos cromossomos marcados, onde foram observadas células apresentando apenas um cromossomo marcado ou células com dois cromossomos marcados pela NOR (Figura 7).

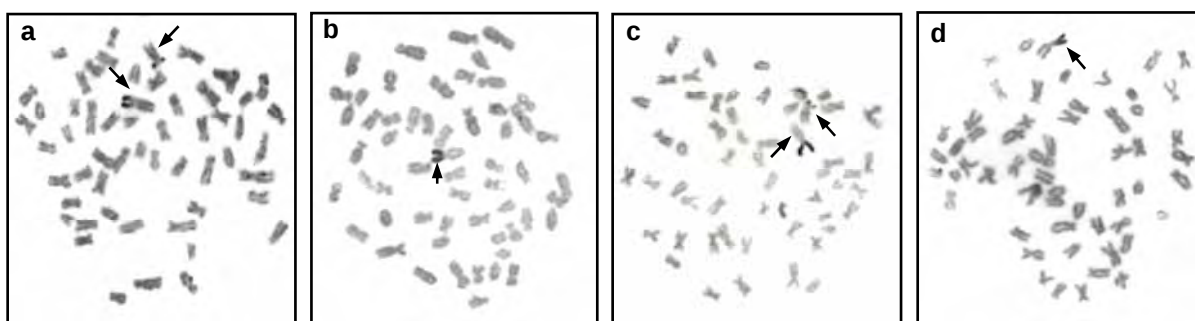


Figura 7 – Metáfases dos híbridos interespecíficos “pintachara” (a, b) e “cachapinta” (c, d) após coloração com nitrato de Prata. Em (a) e (c), dois cromossomos subtelocêntricos marcados; em (b) e (d), apenas um cromossomo marcado. As setas indicam os cromossomos portadores da NOR.

As técnicas de CMA₃ e FISH do DNAr 18S caracterizaram dois cromossomos subtelocêntricos com marcações polimórficas na região terminal do braço curto em ambos os híbridos (Figura 8).

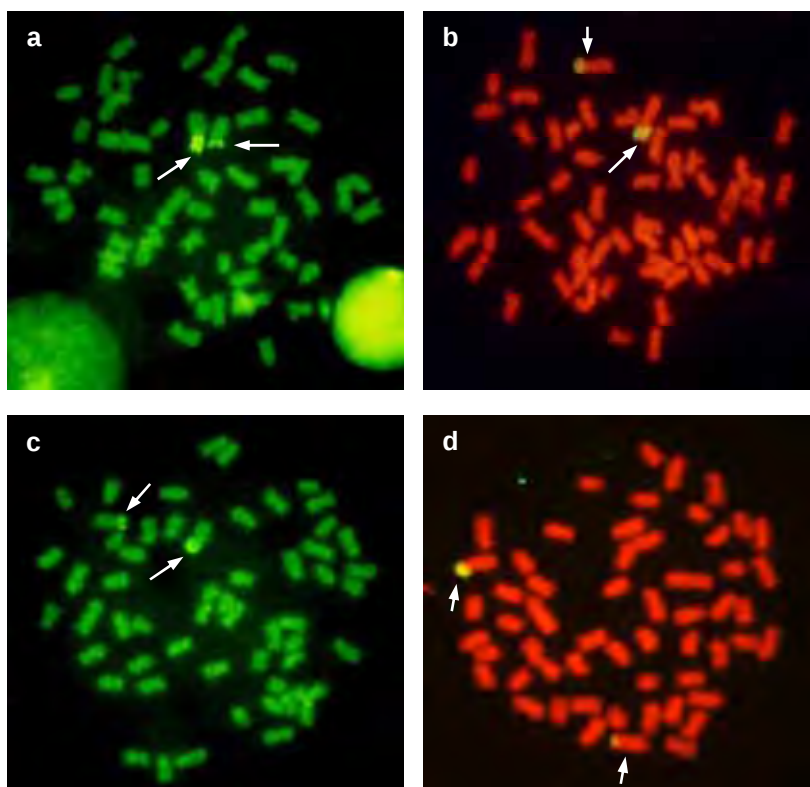


Figura 8 – Metáfases dos híbridos interespecíficos “pintachara” (a, b) e “cachapinta” (c, d) após a coloração com o fluorocromo cromomicina CMA₃ (a, c); FISH com sonda de DNAr 18S (b, d). As setas indicam os sítios cromossomos marcados.

Os genes ribossômicos 5S foram identificados na região pericentromérica de dois cromossomos subtelocêntricos de mesmo tamanho e morfologia, diferentes dos cromossomos da NOR (Figura 9).

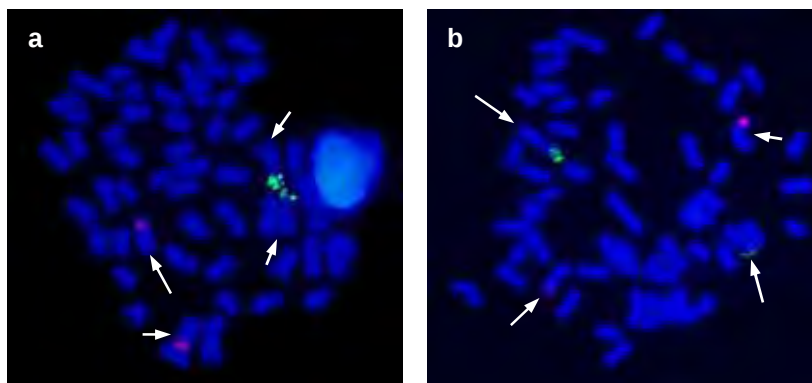


Figura 9 – Metáfases dos híbridos interespecíficos “pintachara” (a) e “cachapinta” (b) após o double FISH com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde). As setas indicam os cromossomos marcados.

DISCUSSÃO

Espécies parentais

Estudos citogenéticos na família Pimelodidae têm demonstrado variações no número diploide de $2n=50$ a $2n=58$, onde $2n=56$ é predominante na maioria das espécies (Swarça *et al.*, 2000; Lundberg e Littmann, 2003). No gênero *Pseudoplatystoma* observa-se uma alta estabilidade no número de cromossomos, evidenciada pelo fato de que as espécies estudadas citogeneticamente até o momento (*P. corruscans*, *P. reticulatum* e *P. tigrinum*), possuem $2n=56$ cromossomos (Swarça *et al.*, 2000; Lundberg e Littmann, 2003), conforme o verificado neste trabalho (Figura 1).

Apesar do número cromossômico conservado, estudos revelam um número fundamental alto, variando de 88 a 100, e diferentes fórmulas cariotípicas descritas

para cada população de *P. corruscans* e *P. reticulatum* de acordo com sua distribuição geográfica. Swarça *et al.* (2005) descreveram um cariótipo constituído por 20M+16SM+8ST+12A (NF=100) para populações de pintado da bacia do Paraguai, e de 26M+10SM+6ST+14A e (NF=98) para bacia do Paraná. Dados encontrados na literatura para cachara do rio Solimões (AM) relataram uma fórmula cariotípica de 18M+14SM+10ST+14A, e NF=88 (Fenocchio e Bertollo, 1992).

No presente trabalho *P. corruscans* e *P. reticulatum* apresentaram cariótipos iguais, compostos por 20m+12sm+12st+12a e NF=100 (Figura 1), em conformidade com o verificado por Porto-Foresti *et al.* (2000) para cachara do rio Aquidauana (Bacia do Paraguai) e dados de Foresti *et al.*, (2007) para pintado da bacia do Alto Paraguai. Estes dados indicam que o pintado e o cachara das bacias do Paraná e Paraguai possuem a mesma fórmula cariotípica e que, algumas diferenças na morfologia cromossômica observadas entre estas espécies nestas regiões podem ser devidas a diferentes interpretações no processo de montagem dos cariótipos, uma vez que os cromossomos destas espécies são pequenos e de difícil análise e classificação.

O bandamento C nestas espécies mostrou pouca quantidade de heterocromatina constitutiva, distribuída nas regiões terminais e pericentroméricas de alguns cromossomos (Figura 2), o que é característico da família Pimelodidae (Fenocchio e Bertollo, 1992; Souza *et al.*, 2004; Carvalho e Dias, 2005; Garcia e Moreira-Filho, 2005; Marques *et al.*, 2008).

Nesta família, NOR simples localizada na região terminal dos cromossomos é a situação mais frequentemente observada, o que, segundo Oliveira e Gosztonyi (2000) representa o estado ancestral para este caráter em Siluriformes. Os parentais aqui estudados mantiveram este padrão de NOR simples, marcada na posição terminal do braço curto (Figura 1), assim como o observado em outros trabalhos

(Fenocchio e Bertollo, 1992; Souza *et al.*, 1997; Bigoni *et al.*, 1992; Porto-Foresti *et al.*, 2000; Swarça *et al.*, 2005).

Diferenças de tamanho da NOR entre os cromossomos homólogos parece ser um evento comum entre os Pimelodidae (Vasconcelos e Martins-Santos, 2000; Swarça *et al.*, 2001; Swarça *et al.*, 2005; Carvalho e Dias, 2007). Este polimorfismo pôde ser verificado nas espécies parentais analisadas neste trabalho após a coloração com Prata (Figura 1) e confirmado com a utilização das técnicas de cromomicina e FISH com sonda de DNAr 18S (Figura 3). Provavelmente, estas diferenças de tamanho da NOR sejam devidas a variações no número de repetições dos genes de DNAr ocasionadas por amplificação gênica ou outros rearranjos envolvendo os cromossomos homólogos, o que é um evento comum em peixes Neotropicais (Foresti *et al.*, 1981; Castro *et al.*, 1998).

A análise do gene ribossômico 5S em ambas as espécies mostrou marcações em um único par cromossômico (Figura 4). O estudo desta região ainda é escasso na família Pimelodidae, mas parece demonstrar o predomínio de apenas dois cromossomos portadores destes sítios ribossomais (Swarça *et al.*, 2005; Carvalho e Dias, 2007). A localização de sítios de DNAr 5S na região pericentromérica de cromossomos distintos dos cromossomos da NOR observada em *P. corruscans* e *P. reticulatum* neste estudo (Figura 4) está de acordo com o observado por Swarça *et al.* (2005) para *P. corruscans*. Segundo Martins e Galetti Jr. (2001) a localização deste gene na posição intersticial estaria relacionada com um maior grau de proteção destas sequências, evitando eventos de transposição e crossing, mais frequentes em áreas terminais.

De uma maneira geral, através das técnicas utilizadas, foi verificado o mesmo padrão citogenético entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*, como número diploide,

morfologia cromossômica e localização da heterocromatina constitutiva e genes ribossômicos, o que pode indicar uma conservação cromossômica nestas espécies pertencentes à família Pimelodidae.

Híbridos interespecíficos

Nos híbridos “pintachara” e “cachapinta”, o número diploide e morfologia dos cromossomos foram iguais ao observado nas espécies parentais, com $2n=56$ cromossomos distribuídos em $20m+12sm+12st+12a$ ($NF=100$) (Figura 5). Relatos na literatura demonstram casos onde híbridos e seus parentais compartilham o mesmo número cromossômico e fórmula cariotípica, como o híbrido entre as espécies pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), que possuem $2n=54$ e um cariótipo de $20m+34sm$ (Almeida-Toledo *et al.*, 1987). Resultados similares foram relatados por Brinn *et al.* (2004), onde duas espécies do gênero *Cichla* e seus híbridos F_1 apresentaram $2n = 48$ cromossomos, todos acrocêntricos.

A análise de regiões heterocromáticas através do bandamento C pode ser utilizada na identificação cromossômica de espécies parentais e híbridos interespecíficos de peixes (Almeida-Toledo *et al.*, 1987; Brin *et al.*, 2004; Porto-Foresti *et al.*, 2008). No presente estudo foi observado o mesmo padrão de heterocromatina constitutiva em espécies parentais e seus híbridos, com marcações terminais e centroméricas em alguns cromossomos do complemento (Figuras 2 e 6). Em híbridos entre os peixes *Cichla monoculus* e *C. temensis*, regiões cromossômicas portadoras de bandas heterocromáticas muito similares não permitiram a distinção entre parentais e híbridos (Brinn *et al.*, 2004).

A análise da NOR nos híbridos “pintachara” e “cachapinta” evidenciou marcações em cromossomos de igual tamanho e morfologia (Figura 5) e a origem parental de cada um destes cromossomos não pode ser identificada. Por outro lado, foi observada uma variação no número de cromossomos marcados pela NOR nas metáfases destes híbridos (Figura 7), que pode estar relacionado a diferenças de atividade desta região, uma vez que o nitrato de Prata se liga a proteínas associadas com o processo de produção dos ribossomos, detectando apenas NORs ativas (Howell, 1977; Jordan, 1987).

Contudo, tais variações podem indicar a ocorrência de dominância nucleolar, onde, enquanto a NOR de um parental está ativa, a do outro parental é silenciada, ou seja, a NOR de um parental é dominante em relação à outra. Este fenômeno foi observado em híbridos de *Drosophila* (Durica e Krider, 1978), *Xenopus* (Reeder e Roan, 1984) e mais recentemente, em híbridos de peixes (Gold *et al.*, 1991; Porto-Foresti *et al.*, 2008, Hashimoto *et al.*, 2009a). Contudo, pela grande similaridade entre a NOR dos parentais pintado e cachara verificada neste trabalho, não foi possível discriminar, nos híbridos, de qual parental foi herdada a NOR dominante ou silenciada. Fato semelhante foi observado em híbridos de ciprinídeos (Gold *et al.*, 1991), onde apenas a morfologia dos cromossomos não foi o suficiente para distinguir o cromossomo parental portador da NOR que o apresentava ativo no híbrido, sendo necessário utilizar o bandamento G para tal diferenciação.

As técnicas de CMA₃ e FISH com sonda de DNAr 18S utilizadas nas metáfases dos híbridos F₁ evidenciaram marcações em dois sítios cromossômicos correspondentes à NOR (Figura 8), indicando que, apesar da variação observada pela coloração com nitrato de Prata, existem dois cromossomos portadores da NOR.

O gene ribossômico 5S foi localizado na porção pericentromérica em dois

cromossomos subtelocêntricos de mesmo tamanho e morfologia (Figura 9), similar ao verificado nos parentais. Estudos de híbridos de peixes através destas metodologias ainda são escassos. Apenas recentemente a FISH foi utilizada no estudo de híbridos entre espécies de *Leporinus* (Hashimoto *et al.*, 2009a e 2009b), permitindo uma análise mais detalhada dos cromossomos destes animais.

Neste estudo foram observadas características citogenéticas indistinguíveis entre as espécies parentais e híbridos analisados, o que não possibilitou sua identificação e diferenciação. Considera-se que, se a constituição cromossômica das espécies parentais for altamente homóloga, é possível um pareamento e segregação corretos durante a meiose e a conseqüente produção de gametas viáveis pelos seus híbridos interespecíficos (Nikolukin, 1946). Tal fato pode ser responsável pela fertilidade dos híbridos analisados neste estudo, os quais, em cativeiro, podem intercruzar e retrocruzar com ambas as espécies parentais (Senhorini, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para uma discussão sobre as características citogenéticas de *P. corruscans* e *P. reticulatum* pertencentes à família Pimelodidae, assim como para a caracterização dos cromossomos de seus híbridos interespecíficos “pintachara” e “cachapinta” e a elucidação de alguns processos cromossômicos que envolvem a hibridação entre estas espécies.

CAPÍTULO 2

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS HÍBRIDOS ENTRE OS BAGRES
NEOTROPICAIS *Pseudoplatystoma corruscans* E *Pseudoplatystoma
reticulatum* (SILURIFORMES, PIMELODIDAE).**

RESUMO

Utilizando-se as técnicas de PCR-RFLP e PCR multiplex de regiões do gene nuclear RAG2 e do gene ribossômico mitocondrial 16S, foram obtidos marcadores moleculares que possibilitaram a perfeita identificação e diferenciação das espécies de peixes *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* e seus híbridos interespecíficos recíprocos. Tais ferramentas podem ser aplicadas na identificação de espécies componentes das linhagens parentais em condições naturais e de cultura, no monitoramento dos híbridos em estoques naturais e cultivados, bem como em programas de conservação.

Palavras chave: *Pseudoplatystoma*; Hibridação interespecífica; Marcadores moleculares; Conservação genética.

INTRODUÇÃO

A hibridação artificial de peixes é realizada em pisciculturas em todo o mundo, com o intuito de se obter indivíduos vantajosos comercialmente (Bartley *et al.*, 2001). Porém, se realizada de forma indiscriminada, esta prática pode levar a sérios problemas, com riscos envolvendo a contaminação genética de estoques de cultivo, comercialização de híbridos no lugar de espécies puras (Toledo-Filho *et al.*, 1998) e escapes para o ambiente natural (Orsi e Agostinho, 1999). Na natureza, a presença destes indivíduos pode determinar desequilíbrios ecológicos (Toledo-Filho *et al.*, 1998; Einum e Fleming, 1997), introgressão genética e até a extinção de espécies parentais (Allendorf *et al.*, 2001; Epifanio e Philipp, 2001).

Os bagres *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), peixes pimelodídeos da ordem Siluriformes, são espécies migratórias de importância ecológica e comercial, amplamente distribuídas pelas bacias hidrográficas da região Neotropical (Miranda, 1997; Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Híbridos entre estas espécies têm sido produzidos em diversas pisciculturas brasileiras (Godinho, 2007; Porto-Foresti *et al.*, 2008), porém são escassos os estudos biológicos sobre estes animais. O presente estudo teve como objetivos a obtenção de marcadores moleculares para identificar as espécies *P. corruscans*, *P. reticulatum* e seus híbridos, uma vez que a identificação genética destes animais é uma etapa essencial para que seja possível o estabelecimento de programas de fiscalização e manejo adequado destes híbridos em pisciculturas, assim como o monitoramento do ambiente natural, permitindo também que medidas de proteção às espécies puras possam ser colocadas em prática (Toledo-Filho *et al.*, 1998; Allendorf *et al.*, 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados geneticamente 34 indivíduos de pintado (*P. corruscans*) e 30 espécimes de cachara (*P. reticulatum*) nas análises correspondentes à linhagem parental. Para a análise das linhagens de híbridos produzidos entre estas espécies, foram utilizados 33 indivíduos identificados como “pintachara”, resultantes de cruzamentos entre fêmea de pintado e macho de cachara, e 31 indivíduos identificados como “cachapinta”, resultantes de cruzamentos entre fêmea de cachara e macho de pintado. Todos os exemplares estudados foram obtidos do estoque de cultivo mantidos no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes

Continental do Instituto Chico Mendes da Conservação de Biodiversidade (CEPTA/ICMBio, Pirassununga, SP), que também é o local onde foram realizados os cruzamentos para obtenção dos híbridos. Os componentes do estoque parental de *P. corruscans* foram capturados no rio Mogi-Guaçu (bacia do Alto Paraná) enquanto os exemplares de *P. reticulatum* foram capturados na região do Pantanal Sul Matogrossense (bacia do Paraguai), porém este centro de pesquisa não disponibilizou informações acuradas a respeito da procedência destas espécies. Os peixes foram identificados e estocados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes, UNESP, Bauru (SP).

Extração de DNA e amplificação gênica por PCR

O DNA genômico total foi isolado seguindo as recomendações do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas adaptações de acordo com o tipo de amostra a ser estudada (nadadeira, fígado ou sangue) e diluído em uma concentração final de 10 a 30ng/ul. A amplificação de uma região do gene nuclear RAG2 e do gene mitocondrial 16S foi realizada através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se os *primers* RAG2 F (5'- CCTGAGTGCTACCTTATTCATGGA-3') e RAG2 R (5'- CTTGGGAGGAAGAGACCATC-3'), desenhados a partir da sequência depositada no Genbank (Número de acesso DQ492364) da espécie *Phractocephalus hemiliopterus*, e os *primers* universais 16S F (5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16S R (5'- CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') descritos por Palumbi (1996).

As amplificações de ambos os genes foram realizadas basicamente em um volume total de 25 µl contendo 150 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50 mM KCl), 0.5

unidades (U) de *Taq Polymerase* (Invitrogen), 0.1 a 0,2 μ M de cada *primer* e 10-50 ng de DNA genômico. Estas reações foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf), basicamente sob as condições de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridização a 52°C por 40 s e extensão a 72° C por 15s, com 35 repetições. Após a reação de PCR, os produtos foram purificados e utilizados como molde para as reações de sequenciamento com o kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences) utilizando o *primer Forward* para cada gene e analisados no sequenciador automático ABIPRISMTM 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer).

PCR-RFLP

Mapas de restrição enzimática foram obtidos e analisados através do programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003). Os produtos de PCR foram digeridos pelas enzimas de restrição em um volume final de 8 μ l contendo 5 μ l dos produtos de PCR, tampão da enzima 1X e 5 unidades da enzima de restrição (10 U/ μ l) (New England Biolabs Inc). O material das reações foi incubado por 2 horas de acordo com a temperatura ideal de cada enzima

PCR Multiplex

As sequências parciais dos genes foram alinhadas através do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa BIOEDIT (Hall, 1999), para verificar pontos de mutação, a partir dos quais foram desenhados os *primers* espécie-específicos. As condições ideais dos *primers* foram analisadas através do programa NetPrimer disponível no site do PREMIER Biosoft International <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>>. As condições e concentrações da reação multiplex foram de acordo com as descritas anteriormente.

Os produtos resultantes das técnicas utilizadas foram aplicados em um gel de agarose 1,5% corado com uma solução de brometo de etídio (1ng/ml), visualizados em luz ultravioleta e posteriormente fotografados através da câmera digital OLYMPUS (CAMEDIA - C-5060 5.1 Megapixel).

RESULTADOS

Os resultados do sequenciamento revelaram sequências parciais do gene nuclear RAG2 (sequência a ser submetida ao *GenBank*) e do gene mitocondrial 16S (sequência a ser submetida ao *GenBank*) com algumas diferenças de composição nucleotídica entre as espécies parentais, permitindo análises de sítios de restrição enzimática e o desenho de *primers* espécie-específicos.

PCR-RFLP

Os mapas de restrição obtidos para estas sequências foram utilizados para identificar enzimas com clivagem específica para cada uma das espécies parentais. Para o gene nuclear, foram observadas quatro enzimas com restrição exclusiva em *P. corruscans* (*Sfa*NI, *Bsr*BI, *Ava*II e *Sau*96I) e 6 enzimas com clivagem apenas em *P. reticulatum* (*Aci*I, *Bst*UI, *Bsa*I, *Bsm*AI, *Hga*I e *Acc*I). Para o gene mitocondrial foi observada uma enzima com sítio de clivagem específico para *P. corruscans* (*Apo*I), enquanto em *P. reticulatum* foram verificadas três enzimas espécie específicas (*Tsp*509I, *Bpu*E I e *Sml*I). Foram selecionadas as enzimas *Sau*96I, com sítio de restrição no gene RAG2 apenas em *P. corruscans* e a enzima *Sml*I, com clivagem específica do gene 16S em *P. reticulatum*.

A amplificação do gene nuclear RAG2 com os *primers* RAG2 F e RAG2 R revelou fragmentos de aproximadamente 550 pb para todas as espécies parentais e híbridos estudados (Figura 1a). Após a restrição enzimática foram verificadas diferenças entre as linhagens parentais, sendo que *P. corruscans* apresentou duas bandas, com cerca de 300 pb e 250 pb, resultantes da digestão enzimática e *P. reticulatum* manteve seu perfil eletroforético contendo uma única banda de cerca de 550 pb. Nos híbridos foram observadas três bandas diagnósticas, sendo duas herdadas de *P. corruscans* e uma de *P. reticulatum*, o que possibilitou sua identificação pelo padrão heterozigótico em relação aos parentais (Figura 1b).

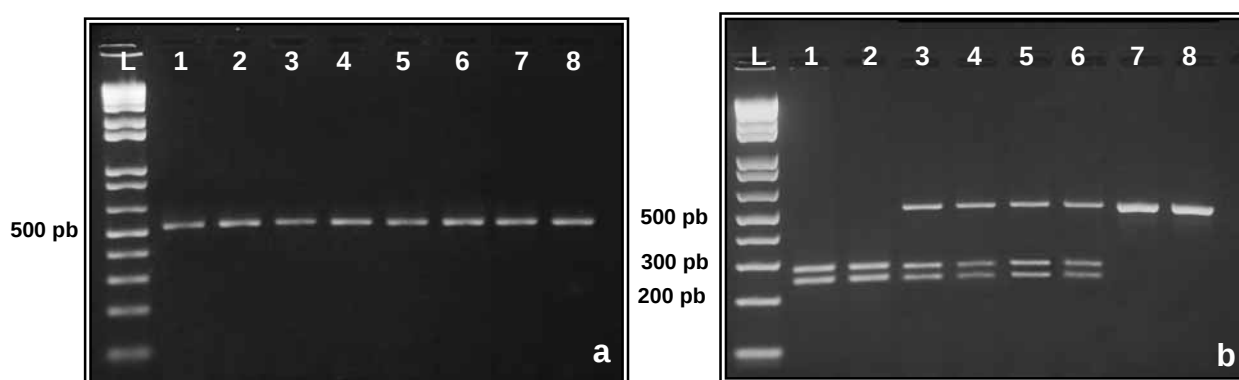


Figura 1 - Em (a) PCR do gene RAG2 e em (b) PCR do gene RAG2 clivado pela enzima *Sau96 I*. *P. corruscans* (1-2), “pintachara” (3-4). “cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

A amplificação do gene mitocondrial 16S através dos *primers* universais 16S F e 16S R revelou bandas de aproximadamente 650 pb para todos os exemplares analisados (Figura 2a). Posteriormente à digestão enzimática, foram verificadas diferenças entre os padrões eletroforéticos das linhagens parentais. *P. corruscans* manteve uma única banda de cerca de 650 pb, pois não houve sítio de clivagem da enzima. Já *P. reticulatum* apresentou duas bandas, uma de aproximadamente 350 pb e outra de cerca de 300 pb, resultantes da restrição enzimática. A aplicação desta

técnica no material obtido do híbrido “pintachara” revelou o mesmo perfil eletroforético observado no parental materno *P. corruscans*, enquanto o híbrido “cachapinta” mostrou as mesmas bandas do parental materno *P. reticulatum* (Figura 2b).

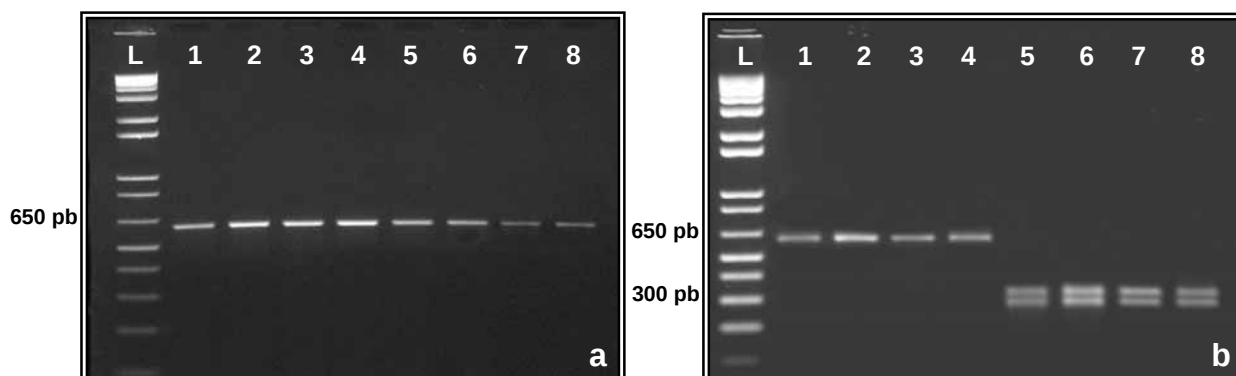


Figura 2 - Em (a) PCR do gene 16S e em (b) PCR do gene 16S clivado pela enzima *Sml* I. *P. corruscans* (1-2), “pintachara” (3-4), “cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

PCR Multiplex

Foram obtidos *primers* espécie específicos para a reação de PCR. Os *primers* para o gene nuclear foram desenhados no sentido *Reverse*, sendo o *primer* *RAG2 PcR* (5′ AACTCCAGGTCAATGAGATAAATG 3′) específico para *P. corruscans* e o *primer* *RAG2 PrR* (5′ CAGTTCCAGGTCTCTGTGGTT 3′) específico para *P. reticulatum*. As amplificações multiplex deste gene (utilizando-se os *primers* *RAG2 F*, *RAG2 R*, *RAG2 PcR* e *RAG2 PrR*) revelaram um fragmento de aproximadamente 550 pb para todos indivíduos analisados, resultante da amplificação pelos *primers* *RAG2 F* e *RAG2 R*. Também foram verificados fragmentos característicos para cada espécie parental, com uma banda de aproximadamente 330 bp para *P. corruscans* e outra de cerca de 290 bp para *P. reticulatum*, ambas resultantes, respectivamente, dos *primers* espécie específicos *RAG2 PcR* e *RAG2 PrR*. Os híbridos mostraram um padrão heterozigoto,

com duas bandas diagnósticas, cada uma herdada de um dos parentais (Figuras 3 e 4).

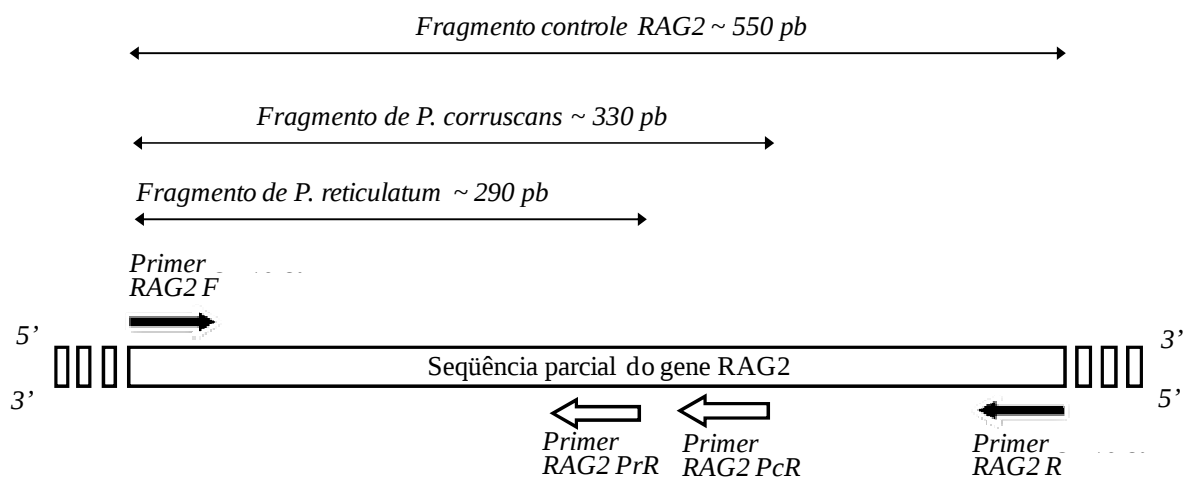


Figura 3 - Sítios de reconhecimento e orientação dos *primers* RAG2 F e RAG2 R (setas fechadas) e *primers* espécie-específicos (setas abertas) das regiões amplificadas do gene nuclear RAG2.

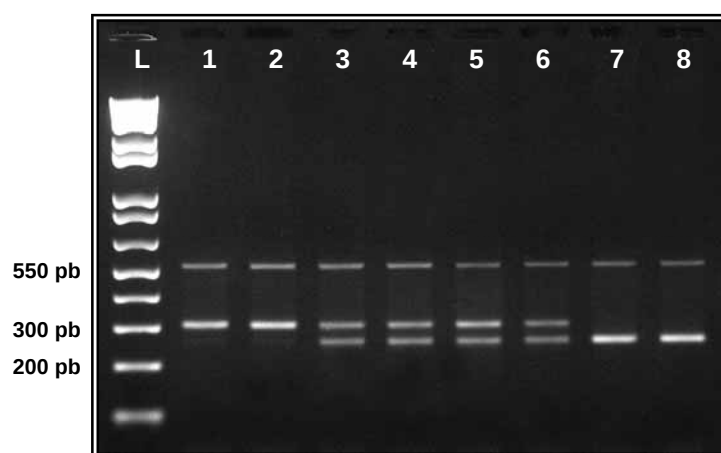


Figura 4 – PCR multiplex do gene nuclear RAG2. *P. corruscans* (1-2), “pintachara” (3-4). “cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Para o gene mitocondrial os *primers* foram desenhados em sentidos opostos, sendo o *primer* 16S PcF (5'-TGACCATAAAGATCCGGCTAT-3'), no sentido *Foward*, específico para *P. corruscans* e o *primer* 16S PrR (5'-TCTTGGTTTTGGGGTTGTTA-3'), no sentido *Reverse*, específico para *P. reticulatum*. As amplificações multiplex

deste gene (utilizando-se os *primers* 16S F, 16S R, 16S PcF e 16S PrR) mostraram diferentes perfis eletroforéticos entre estas espécies. Como produto resultante dos *primers* universais 16S F e 16S R, ambos apresentaram um fragmento de aproximadamente 650 pb. Além disto, em *P. corruscans* foi evidenciado um fragmento com cerca de 200 pb, enquanto que *P. reticulatum* apresentou uma banda de aproximadamente 400 pb, ambos resultantes dos *primers* específicos. Esta reação em amostras do híbrido “pintachara” revelou o mesmo padrão eletroforético do parental materno pintado, enquanto o híbrido “cachapinta” apresentou bandas iguais ao parental materno cachara (Figuras 5 e 6).

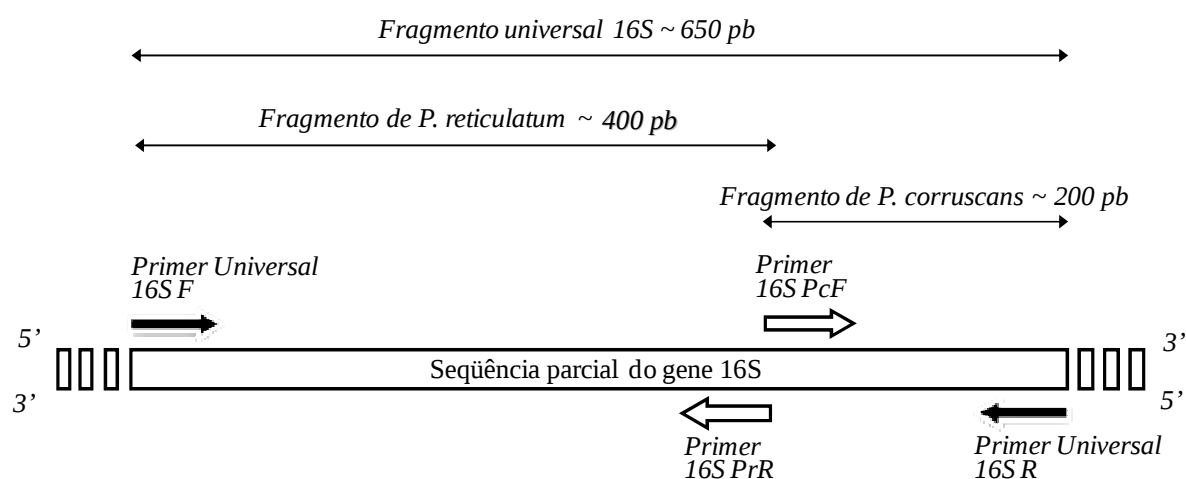


Figura 5 - Sítios de reconhecimento e orientação dos *primers* universais (setas fechadas) e *primers* espécie-específicos (setas abertas) das regiões amplificadas do gene mitocondrial 16S.

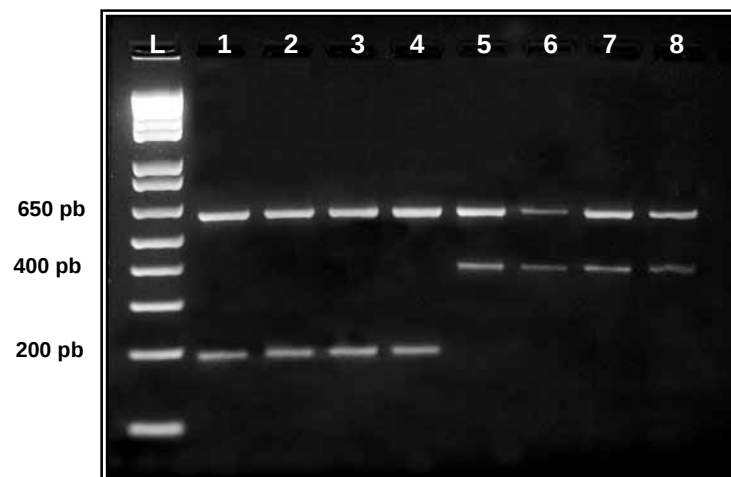


Figura 6 – PCR multiplex do gene mitocondrial 16S. *P. corruscans* (1-2), “pintachara” (3-4). “cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

DISCUSSÃO

Marcadores moleculares com base em polimorfismos de regiões do DNA nuclear e DNA mitocondrial têm sido amplamente empregados no estudo de espécies de peixes (Scribner *et al.*, 2001; Liu e Cordes, 2004; Teletchea, 2009). Entre as diversas técnicas disponíveis, a PCR-RFLP e PCR multiplex são cada vez mais utilizadas na identificação de espécies deste grupo de vertebrados (Mendonça *et al.*, 2009, Hashimoto *et al.*, 2009c), principalmente pelo fato de serem de custo relativamente baixo quando comparadas à outras técnicas moleculares, exigirem pouco tempo de execução e permitirem a análise de um grande número de amostras simultaneamente (Teletchea, 2009).

Neste estudo, o sequenciamento de uma região do gene nuclear RAG2 e do gene mitocondrial 16S mostrou diferenças significativas na sequência de nucleotídeos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, as quais podem ser resultantes de mutações pontuais ocasionadas por deleções,

inserções ou substituições de bases. Apesar destes genes serem considerados conservados em peixes, tais diferenças foram suficientes para identificar e diferenciar estas espécies (Figuras 1 a 6). Cabe aqui ressaltar que, apesar das metodologias utilizadas terem base em polimorfismos de poucos nucleotídeos, cada uma das espécies analisadas apresentou um padrão molecular distinto, sem a ocorrência de variações intraespecíficas, o que comprova o conservadorismo e especificidade destas regiões gênicas.

A identificação genética dos produtos resultantes de uma hibridação interespecífica constitui uma etapa essencial em projetos que realizam esta prática de melhoramento animal, de modo que se possa identificar corretamente os produtos e evitar contaminações genéticas e “misturas” destes animais com espécies puras utilizadas como parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1994 e 1998; Porto-Foresti e Foresti, 2004). A análise do gene nuclear nos híbridos interespecíficos permitiu a perfeita identificação destes animais, que mostraram um padrão de bandas heterozigoto, distinto do verificado nas espécies parentais (Figuras 1 e 4).

Os estudos de caracterização do processo de hibridação também podem ser aperfeiçoados através da análise do DNA mitocondrial, que possibilita a identificação do parental materno envolvido em cada cruzamento (Rosenfield *et al.*, 2000). Neste trabalho, a análise do gene mitocondrial 16S possibilitou a distinção dos híbridos “pintachara” e “cachapinta” entre si, os quais apresentaram diferentes padrões eletroforéticos de acordo com os parentais maternos e paternos envolvidos nos cruzamentos que lhes deram origem (Figuras 2 e 6). Tal discriminação é importante, uma vez que híbridos recíprocos podem apresentar diferentes características biológicas e zootécnicas (Toledo-Filho *et al.*, 1998; Porto-Foresti *et al.*, 2008).

A ocorrência de fertilidade identificada nos híbridos obtidos nos cruzamentos entre o pintado *P. corruscans* e a cachara *P. reticulatum* (José Senhorini, comunicação pessoal) aumenta os riscos destes indivíduos para a natureza, que poderia determinar mudanças prejudiciais e irreversíveis nas populações nativas de populações destas espécies e até mesmo à sua extinção. É considerado que, para uma identificação precisa de híbridos pós-F₁ (híbridos F₂ e retrocruzamentos) são necessários, no mínimo, quatro marcadores moleculares (Boecklen e Howard, 1997). Nesse sentido, os marcadores aqui obtidos poderiam fazer parte destas análises em estudos futuros, quando utilizados em conjunto com outros marcadores.

Os marcadores moleculares obtidos neste trabalho, através das técnicas de PCR-RFLP e PCR multiplex, mostraram-se eficientes para uma identificação rápida e confiável das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*, bem como de seus híbridos interespecíficos. Estes marcadores podem ser aplicados no monitoramento da produção e comercialização destes híbridos em pisciculturas, assim como em programas de conservação das espécies parentais, tanto em condições naturais quanto de cultura, no intuito de dar suporte a programas de conservação e monitoramento genético destas espécies.

CAPÍTULO 3

**OCORRÊNCIA DE HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E
Pseudoplatystoma reticulatum NOS RIOS PARAGUAI (BACIA DO PARAGUAI) E
MOGI-GUAÇU (BACIA DO ALTO PARANÁ), BRASIL: EVIDÊNCIAS DE
CONTAMINAÇÃO GENÉTICA DO AMBIENTE NATURAL.**

RESUMO

Marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP e PCR multiplex de regiões do genoma nuclear e mitocondrial foram aplicados em amostras de *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), provenientes do rio Paraguai, MS (bacia do Paraguai) e do rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná), a fim de identificar a possível ocorrência de híbridos interespecíficos de pintado e cachara nestas localidades. Foram identificados 2 híbridos interespecíficos no rio Paraguai, sendo 1 do tipo “pintachara”, resultante do cruzamento entre fêmea de pintado x macho de cachara e 1 “cachapinta”, resultante do cruzamento entre fêmea de cachara x macho de pintado. No rio Mogi-Guaçu foram verificados 2 híbridos “pintachara” e 3 “cachapinta”. Considera-se que estes animais foram possivelmente introduzidos nestes ambientes ou resultaram de escapes de pisciculturas ou “pesque-pagues” da região. Estes resultados atestam a existência de híbridos em rios importantes onde as espécies parentais ocorrem e evidenciam a necessidade de que programas de fiscalização e acompanhamento do processo de hibridação realizado nas pisciculturas e empresas relacionadas à reprodução de peixes sejam colocados em prática. A simplicidade e rapidez de execução dos processos envolvendo a utilização de marcadores dos tipos PCR-RFLP e PCR multiplex utilizados confirmam sua eficiência na identificação das espécies *P. corruscans*, *P. reticulatum* e seus híbridos.

Palavras chave: *Pseudoplatystoma*; Híbridos interespecíficos; Escapes; Contaminação genética; Marcadores moleculares.

INTRODUÇÃO

Os bagres Neotropicais *Pseudoplatystoma. corruscans* (pintado) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) são espécies migratórias amplamente distribuídas nas bacias hidrográficas brasileiras (Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Estes peixes apresentam alto valor econômico e importância de pesca nas bacias em que ocorrem, principalmente por serem animais de grande porte e com boa qualidade de carne para o consumo (Miranda, 1997; Inove *et al.*, 2003).

A hibridação artificial entre estas espécies já faz parte da rotina de muitas empresas voltadas às atividades de piscicultura no país, principalmente pelo fato de ter por base uma metodologia de fácil aplicação, que permite a sua utilização em cultivos do tipo extensivo, além das vantagens zootécnicas apresentadas por certos produtos híbridos em relação a seus parentais (Godinho, 2007; Porto-Foresti *et al.*, 2008).

Porém, a falta de mecanismos de identificação das espécies, de fiscalização e manejo adequado dos produtos, estes híbridos podem ser confundidos com seus parentais, serem introduzidos em ambientes diversos ou naturais quando da ocorrência de escapes de pisciculturas ou estações de criação (Toledo-Filho *et al.* 1998, Orsi e Agostinho, 1999) e “pesque-pagues” (Fernandes *et al.*, 2003). Os resultados são de difícil previsão e dependem basicamente dos graus de viabilidade, desempenho e capacidade dos híbridos se reproduzirem na natureza, podendo ocasionar desde desequilíbrios ecológicos até eventos de introgressão genética e a extinção das espécies parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1996; Huxel, 1999; Epifanio e Philipp, 2001).

O monitoramento genético da hibridação consiste na aplicação de

metodologias precisas que identifiquem e diferenciem linhagens híbridas e seus parentais (Toledo-Filho *et al.* 1994; Porto-Foresti e Foresti, 2004). A realização de monitoramento do ambiente natural permite determinar a situação deste ambiente em relação à ocorrência de híbridos e propor medidas cabíveis de manejo e de proteção e conservação das espécies nativas (Allendorf *et al.*, 2001).

Apesar de a hibridação de peixes ser uma prática comum no Brasil, ainda são escassos os dados sobre a ocorrência de híbridos no ambiente natural e se estão se reproduzindo com as espécies nativas. Existem relatos da captura de indivíduos com características morfológicas intermediárias entre o pintado e cachara no rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná) onde anteriormente ocorria, de maneira natural, apenas o pintado (José Senhorini, comunicação pessoal). Neste trabalho buscou-se identificar exemplares de *P. corruscans* e *P. reticulatum* provenientes do Rio Paraguai, MS (bacia do Paraguai) e do rio Mogi-Guaçu com o uso de marcadores moleculares, a fim de verificar se híbridos entre estas espécies estão ocorrendo nestes ambientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas geneticamente amostras de tecidos (sangue e nadadeira) de 25 exemplares de *Pseudoplatystoma corruscans* e 25 exemplares de *Pseudoplatystoma reticulatum* do rio Paraguai, MS (bacia do Paraguai) e de 21 exemplares de *P. corruscans* provenientes do rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná).

O DNA genômico total foi isolado seguindo as recomendações do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas

adaptações de acordo com o tipo de amostra a ser estudada (nadadeira ou sangue) e diluída em uma concentração final de 10 a 30ng/ul. A amplificação de uma região do gene nuclear RAG2 e do gene mitocondrial 16S foi realizada através de PCR, utilizando-se os *primers* RAG2 F (5'- CCTGAGTGCTACCTTATTCATGGA-3') e RAG2 R (5'-CTTGGGAGGAAGAGACCATC-3'), de acordo com Prado *et al.* (Capítulo 2) e os *primers* universais 16S F (5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16S R (5'- CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'), como descrito por Palumbi (1996).

As amplificações de ambos os genes foram realizadas basicamente em um volume total de 25 µl contendo 150 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50 mM KCl), 0.5 unidades (U) de *Taq Polymerase* (Invitrogen), 0.1 a 0,2 µM de cada *primer* e 10-50 ng de DNA genômico. Estas reações foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf), basicamente sob as condições de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridização a 52°C por 40 s e extensão a 72° C por 15s, com 35 repetições.

Os produtos de PCR foram digeridos utilizando-se a enzima de restrição *Sau96 I* para o gene nuclear RAG2, específica para *P. corruscans* e a enzima *Sml I* para o gene mitocondrial 16S, específica para *P. reticulatum*, conforme descrito por Prado *et al.* (Capítulo 2). As reações ocorreram em um volume final de 8 µl contendo 5 µl dos produtos de PCR, tampão da enzima 1X e 5 unidades da enzima de restrição (10 U/µl) (New England Biolabs Inc). Os produtos das reações foram incubados por 2 horas de acordo com a temperatura ideal de cada enzima.

Para as reações de PCR multiplex de uma região do gene nuclear RAG2 foram utilizados, além dos *primers* RAG2 F e RAG2 R, os *primers* espécie específicos RAG2 PcR (5' AACTCCAGGTCAATGAGATAAATG 3') para *P. corruscans* e RAG2 PrR (5' CAGTTCCAGGTCTCTGTGGTT 3') para *P. reticulatum*,

ambos estruturados no sentido *Reverse* (Prado *et al.*, Capítulo 2). Para a amplificação multiplex de uma região do gene mitocondrial 16S foram utilizados os *primers* 16S *PcF* (5'-TGACCATAAAGATCCGGCTAT-3'), no sentido *Foward*, específico para *P. corruscans* e o *primer* 16S *PrR* (5'-TCTTGGTTTTGGGGTTGTTA-3'), no sentido *Reverse*, específico para *P. reticulatum* (Prado *et al.*, Capítulo 2), além dos *primers* universais 16S *F* e 16S *R* (Palumbi, 1996). As condições e concentrações dos componentes da reação multiplex foram programadas de acordo com as descritas anteriormente.

Os produtos resultantes destas reações foram aplicados em um gel de agarose 1,5% corado com uma solução de brometo de etídio (1ng/ml), visualizados em luz ultravioleta e posteriormente fotografados através da câmera digital OLYMPUS (CAMEDIA - C-5060 5.1 Megapixel).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação da técnica de PCR-RFLP em uma região do gene nuclear RAG2 revelou fragmentos de cerca de 550 pb para todos os indivíduos analisados. Após a reação de restrição enzimática, todos os exemplares de *P. corruscans* do rio Paraguai (n=25) e 16 indivíduos de *P. corruscans* do rio Mogi-Guaçu apresentaram um padrão eletroforético de duas bandas, de aproximadamente 300 e 250 pb, resultantes do processo de digestão enzimática. Entre os exemplares de *P. reticulatum* do rio Paraguai, 23 apresentaram uma única banda de cerca de 550 pb, pois não ocorreu a clivagem pela enzima. Além disto, 2 exemplares pertencentes às amostras do rio Paraguai e 5 exemplares pertencentes às amostras do rio Mogi-Guaçu apresentaram

um padrão heterozigoto de bandas de aproximadamente 500, 300 e 250 pb (Figuras 1, 2 e Tabela 1).

De acordo com Prado *et al.* (Capítulo 2), na identificação das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* e seus híbridos interespecíficos, foi observado que apenas *P. corruscans* apresenta sítio de clivagem da enzima *Sau96 I* para esta região do gene nuclear RAG2. Assim, os exemplares analisados neste trabalho que apresentaram duas bandas resultantes da clivagem enzimática podem ser identificados como pertencentes à linhagem parental pintado *P. corruscan*, enquanto os indivíduos que mantiveram o padrão de cerca de 550 pb, sem a restrição pela enzima, podem ser identificados como cachara *P. reticulatum* (Tabela 1). Já as bandas heterozigotas observadas em alguns indivíduos do rio Mogi-Guaçu indicam que estes exemplares são híbridos interespecíficos (linhagem F₁) entre pintado e cachara, conforme observado por Prado *et al.* (Capítulo 2) e herdaram as bandas de cerca de 300 pb e 250 pb do parental pintado e a banda de aproximadamente 550 pb do parental cachara (Figuras 1, 2 e Tabela 1).

A aplicação da técnica de PCR multiplex do gene nuclear também auxiliou na identificação destes animais neste trabalho. Além das bandas de cerca de 550 pb observadas em todos os exemplares, foram verificados fragmentos resultantes da amplificação pelos *primers* espécie específicos, de aproximadamente 330 pb para o pintado, 290 bp para o cachara, e duas bandas diagnósticas para os híbridos, de aproximadamente 330 bp e 290 bp, como descrito por Prado *et al.* (Capítulo 2).

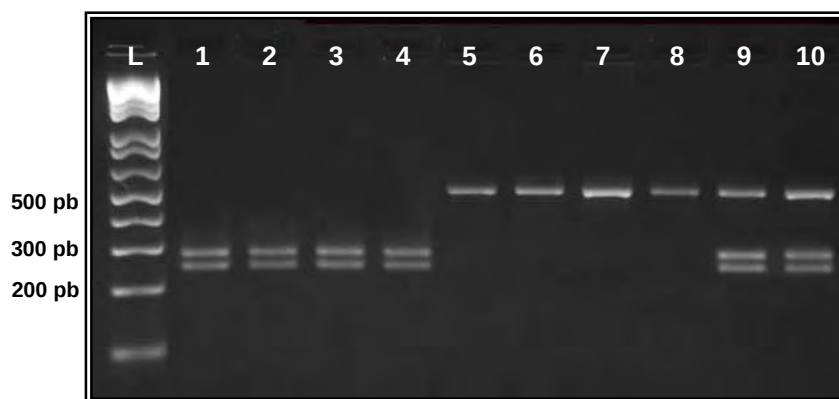


Figura 1 – PCR-RFLP de uma região do gene nuclear RAG2 das amostras provenientes do Rio Paraguai, MS, bacia do Paraguai. Padrão molecular observado para *P. corruscans* (1-4), *P. reticulatum* (5-8) e híbridos interespecíficos destas espécies (9-10). Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

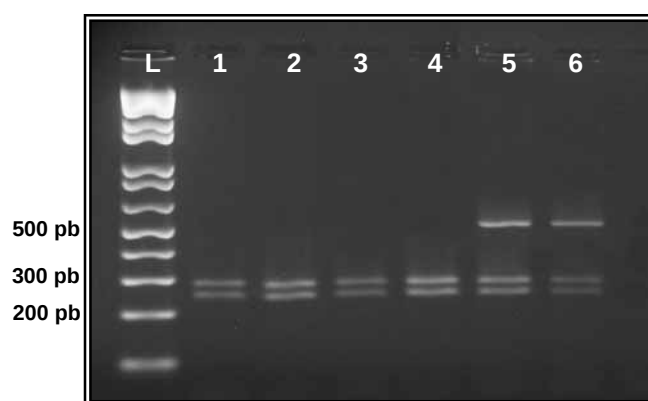


Figura 2 – PCR-RFLP de uma região do gene nuclear RAG2 das amostras provenientes do rio Mogi-Guaçu, SP, bacia do Alto Paraná. Padrão molecular observado para *P. corruscans* (1-4) e híbridos interespecíficos de *P. corruscans* e *P. reticulatum* (5-6). Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Para uma região do gene mitocondrial 16S, o PCR-RFLP revelou que os exemplares de *P. corruscans* mantiveram uma única banda de quase 650 pb, pois não houve sítio de clivagem da enzima. Os exemplares de *P. reticulatum* mostraram duas bandas diagnósticas, uma de aproximadamente 350 pb e outra de cerca de 300 pb, resultantes da restrição enzimática. Na amostra do Rio Paraguai, 1 indivíduo apresentou a mesma banda do pintado e o outro manteve fragmentos iguais ao

cachara enquanto no rio Mogi-Guaçu 2 híbridos apresentaram as bandas do pintado e 3 mostraram um padrão eletroforético igual ao cachara.

As amplificações multiplex do gene mitocondrial revelaram, além de fragmentos de 650 pb para todos exemplares estudados, bandas específicas de cerca de 200 pb para *P. corruscans* e fragmentos de aproximadamente 400 pb para *P. reticulatum*. Entre os 2 exemplares híbridos do rio Paraguai, 1 apresentou as mesmas bandas que o pintado e o outro o mesmo perfil eletroforético do cachara (Figura 3 e Tabela 1). Já entre os 5 exemplares híbridos do rio Mogi-Guaçu, 2 apresentaram o mesmo padrão de bandas do pintado e três mantiveram os fragmentos eletroforéticos do cachara (Figura 4 e Tabela 1).

O estudo de regiões do DNA mitocondrial pode ser útil na identificação de híbridos recíprocos, pois, por ser transmitido apenas por via materna (Avisé, 1986; Moritz *et al.*, 1987), permite verificar o parental materno envolvido em cada cruzamento (Rosenfield *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 2009c). A análise de uma região do gene mitocondrial 16S permitiu a obtenção de marcadores específicos para cada uma das espécies parentais, pintado e cachara, possibilitando a distinção de seus híbridos “pintachara” (resultante do cruzamento de fêmea de pintado com macho de cachara), que apresentou o mesmo padrão de bandas do parental materno pintado e “cachapinta” (resultante do cruzamento de fêmea de cachara com macho de pintado) com bandas eletroforéticas iguais ao cachara (Prado *et al.*, Capítulo 2).

Neste trabalho, a análise do gene mitocondrial 16S permitiu verificar que alguns híbridos encontrados na natureza apresentaram o DNA mitocondrial de *P. corruscans* e outros o DNA mitocondrial de *P. reticulatum*, os quais, segundo Prado *et al.* (Capítulo 2) podem ser identificados, respectivamente, como “pintachara” e “cachapinta”. Esta distinção é importante, uma vez que estes animais podem

apresentar diferentes características biológicas (Toledo-Filho *et al.*, 1998; Porto-Foresti *et al.*, 2008) e, na natureza, interagir ecologicamente e geneticamente de maneiras diferentes com seus parentais.

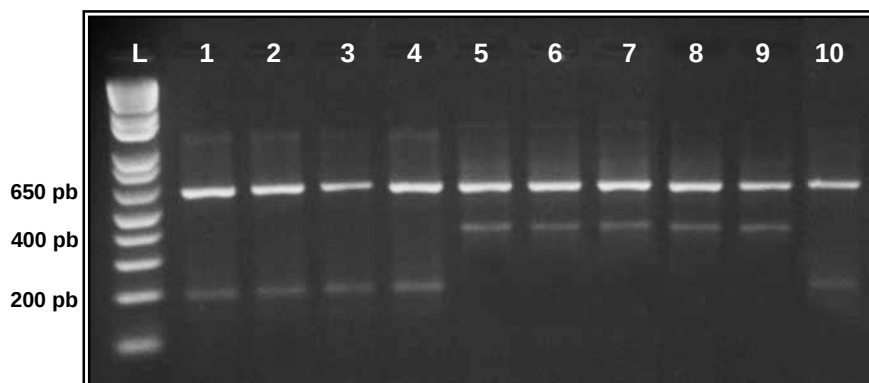


Figura 3 – PCR multiplex de uma região do gene mitocondrial 16S das amostras provenientes do rio Paraguai. Padrão molecular observado para *P. corruscans* (1-4), *P. reticulatum* (5-8) híbridos interespecíficos “cachapinta” (9) e “pintachara” (10) e Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

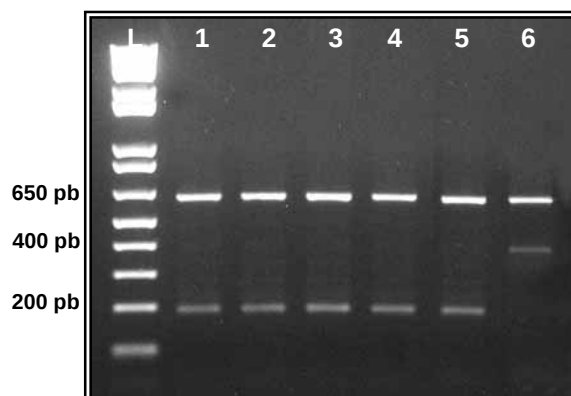


Figura 4 – PCR multiplex de uma região do gene mitocondrial 16S das amostras provenientes do rio Mogi-Guaçu. Padrão molecular observado para *P. corruscans* (1-4), híbrido interespecífico “pintachara” (5), híbrido interespecífico “cachapinta” (6). Gel de agarose 1,5%, L, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Tabela 1 - Resultados moleculares observados para os exemplares de *P. corruscans* e *P. reticulatum*, locais de coleta e as prováveis linhagens a que pertencem. P=padrão molecular do pintado; C=padrão molecular do cachara; H=padrão molecular dos híbridos interespecíficos F₁.

Local de coleta	Amostras	Nº de Indivíduos	Padrão molecular		Provável Linhagem
			Nuclear	Mitocondrial	
Rio Paraguai, MS (bacia do Paraguai)	<i>P. corruscans</i>	25	P	P	<i>P. corruscans</i> (pintado)
		23	C	C	<i>P. reticulatum</i> cachara
	<i>P. reticulatum</i>	1	H	P	Híbrido F ₁ “pintachara”
		1	H	C	Híbrido F ₁ “cachapinta”
Rio Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná)		16	P	P	<i>P. corruscans</i> (pintado)
	<i>P. corruscans</i>	2	H	P	Híbrido F ₁ (“pintachara”)
		3	H	C	Híbrido F ₁ (“cachapinta”)

Os marcadores utilizados neste trabalho permitiram identificar a ocorrência dos híbridos interespecíficos de pintado e cachara, “pintachara” e “cachapinta” em amostras capturadas no ambiente natural, nos rios Paraguai e Mogi-Guaçu (Figuras 1-4 e Tabela 1). No rio Mogi-Guaçu, estes indivíduos híbridos seriam possivelmente resultantes de introduções e/ou escapes de pisciculturas ou “pesque-pagues”, uma vez que o cachara não é de ocorrência natural nos rios desta região e não há registro de ocorrência da espécie, como uma possível linhagem parental pura neste ambiente. Assim, a ocorrência de hibridação natural entre estas espécies seria dificultada (José Senhorini, comunicação pessoal). O fato de terem sido detectados aparentemente apenas indivíduos híbridos de primeira geração ou F₁, reforçaria a hipótese de que a sua presença nestes ambientes seria recente e possivelmente decorrente de escapes ou de eventuais introduções intencionais, feitas com o objetivo de fomentar a pesca esportiva. Já no Rio Paraguai, onde *P. corruscans* e *P. reticulatum* podem ocorrer em

simpatria (Buitrago-Suárez e Burr, 2007), não pode ser descartada a hipótese de que a ocorrência dos híbridos poderia ter ocorrido pelo cruzamento natural entre estas espécies. Contudo, o fato da produção destes híbridos ter se tornado uma prática comum na região, aliado à constatação de que os escapes de espécies cultivadas para o meio ambiente, quando não há um manejo adequado, são praticamente inevitáveis (Orsi e Agostinho, 1999; Fernandes *et al.*, 2003), indicaria que a presença destes híbridos na natureza poderia ser resultado da hibridação artificial em pisciculturas da região.

A detecção da hibridação em populações selvagens é uma etapa essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação e gestão do meio ambiente (Allendorf *et al.*, 2001). Porém, até o momento, no Brasil, são escassos os estudos que envolvam a aplicação de marcadores genéticos no estudo da hibridação em populações naturais de peixes. Os híbridos interespecíficos de pintado e cachara podem apresentar fertilidade em cativeiro (José Senhorini, comunicação pessoal), porém, não se sabe quais os reais níveis de fertilidade destes animais, se as gerações de híbridos pós-F₁ são viáveis ou férteis e quais seriam as interações ecológicas e genéticas resultantes da ocorrência destes animais no ambiente natural, em associação com uma ou ambas as espécies parentais, como é o caso dos indivíduos dos rios Paraguai e Mogi-Guaçu analisados neste trabalho. Estudos mais aprofundados são necessários para a identificação de possíveis linhagens pós-F₁ e possíveis eventos de introgressão genética envolvendo estes híbridos natureza.

As consequências da presença de híbridos artificiais na natureza são de difícil previsão. Em alguns casos, híbridos introduzidos em ambientes naturais formam agrupamentos populacionais que coexistem com as espécies parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1994). Porém, se os híbridos forem férteis, pode ocorrer contaminação genética

através de retrocruzamentos com seus parentais e introgressão, resultando na formação de uma população na qual essencialmente todos os indivíduos possuiriam origem híbrida (Allendorf *et al.*, 2001). Alguns estudos fornecem evidências de que, nestes casos, a hibridação pode promover a extinção das espécies parentais (Huxel *et al.*, 1999; Epifanio e Philipp, 2001; Muhlfeld *et al.*, 2009).

Os resultados observados neste trabalho relatam, portanto, a ocorrência dos híbridos “pintachara” e “cachapinta” em dois importantes rios das bacias do Paraguai e do Alto Paraná, apresentados como um indicativo de contaminação do ambiente natural. Os marcadores moleculares PCR RFLP e PCR multiplex utilizados neste estudo mostraram ser metodologias simples, rápidas e de baixo custo, eficazes para serem implementadas de forma rotineira no monitoramento e fiscalização da produção destes híbridos nas pisciculturas e no ambiente natural. Considera-se ainda que a utilização desta metodologia possibilitaria o delineamento de planos de conservação biológica das espécies nativas de interesse zootécnico e um manejo adequado dos estoques naturais e cultivados de peixes.

4 DISCUSSÃO GERAL

A hibridação artificial entre diferentes espécies de peixes tem se tornado uma prática comum em diversas pisciculturas mundiais e nacionais e tem por objetivo principal a obtenção de indivíduos com melhores características zootécnicas em relação a seus parentais, como crescimento rápido, boa qualidade da carne, resistência a doenças, capacidade de tolerar variações ambientais, entre outras vantagens para o cultivo.

Considera-se que híbridos interespecíficos sejam morfologicamente intermediários em relação aos seus parentais, o que possibilitaria a sua identificação. No entanto, muitas vezes a identificação não é possível, principalmente na fase de alevinos onde os híbridos podem ser semelhantes a uma ou outra espécie parental, tornando a identificação morfológica confusa e duvidosa.

A possível “mistura” de híbridos e espécies puras pode ocasionar diversos tipos de problemas, tanto para o cultivo como para o meio ambiente. Os híbridos podem contaminar geneticamente estoques cultivados, serem comercializados erroneamente como sendo as espécies puras e assim serem distribuídos sem qualquer controle. Os riscos também envolvem introduções e escapes de indivíduos híbridos para a natureza, ocasionando impactos genéticos e ecológicos negativos, como a introgressão genética e até a perda da identidade genética e até a extinção das espécies parentais no ambiente selvagem.

As espécies *P. corruscans* (pintado) e *P. reticulatum* (cachara) encontram-se distribuídas em diversas bacias hidrográficas brasileiras. Estes peixes são de grande importância econômica, porém, tem sido observada uma diminuição da sua captura na natureza, principalmente devido à pesca excessiva e à degradação do meio

ambiente. O grande interesse no cultivo destas espécies tem levado alguns piscicultores a realizarem reprodução induzida e cruzamentos que podem envolver diferentes espécies e resultar na produção de híbridos vantajosos comercialmente. Do cruzamento entre o pintado, *P. corruscans* e a cachara, *P. reticulatum*, podem ser produzidos dois híbridos viáveis, o “pintachara” (resultante do cruzamento entre fêmea de pintado e macho de cachara) e o “cachapinta” (resultante do cruzamento entre fêmea de cachara e macho de pintado). Muitas vezes estes tipos de híbridos não são discriminados pelos criadores de peixes e são popularmente chamados de “ponto e vírgula”, por apresentarem ao mesmo tempo pintas (característica marcante do pintado) e listras (característica marcante do cachara).

Assim, dadas as dificuldades decorrentes da caracterização morfológica dos produtos dos cruzamentos entre espécies de peixes, verifica-se uma crescente necessidade de desenvolvimento de metodologias precisas para a discriminação efetiva destes indivíduos manipulados geneticamente e a diferenciação de seus parentais. A aplicação de técnicas genéticas no diagnóstico de híbridos, como a citogenética e genética molecular, apresentam-se como etapas importantes a serem realizadas visando à consecução de objetivos voltados para um correto monitoramento das matrizes e produtos nas pisciculturas, bem como das espécies no seu ambiente natural, a fim de evitar os riscos que representam atividades com organismos modificados, que podem voltar aos ambientes de origem.

Através das metodologias citogenéticas, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram características cromossômicas indistinguíveis entre *P. corruscans*, *P. reticulatum* e seus híbridos interespecíficos, por apresentarem o mesmo número diploide, cariótipos indistinguíveis pela metodologia básica comumente utilizada, pela ausência de bandas heterocromáticas diferenciais e de

cromossomos portadores da NOR em posições espécies específicas, bem como de ausência de diferenças específicas no mapeamento dos genes ribossômicos 18S e 5S. A homogeneidade encontrada entre os cariótipos não possibilitou sua identificação e diferenciação. A semelhança cromossômica entre o pintado e a cachara poderia possivelmente explicar o fato dos híbridos “pintachara” e “cachapinta” serem férteis (José Senhorini, comunicação pessoal), o que, em cativeiro, poderia resultar em intercruzamentos e retrocruzamentos com ambas as linhagens parentais.

De certo modo, os resultados obtidos nos estudos citogenéticos destas espécies e dos híbridos contribuíram para um melhor conhecimento dos cromossomos entre os peixes representantes da família Pimelodidae. Em relação aos híbridos, foi possível verificar que estes são diploides simples e mantêm as mesmas características citogenéticas de seus parentais, sem a ocorrência de rearranjos cromossômicos. Além disto, foi possível verificar algumas características genéticas envolvidas com o processo de hibridação, como a dominância nucleolar, fenômeno comum em híbridos interespecíficos de várias espécies de plantas e animais.

Em relação à aplicação das metodologias moleculares, as técnicas de PCR RFLP e PCR multiplex de regiões do DNA nuclear e do DNA mitocondrial possibilitaram a perfeita identificação do pintado, *P. corruscans*, do cachara, *P. reticulatum* e de seus híbridos interespecíficos, além da discriminação entre “pintachara” e “cachapinta”, com relação às suas origens. Estas técnicas mostraram ser de execução rápida e simples, e condizem com a atual necessidade do desenvolvimento de metodologias que requerem pouco tempo de execução, baixa complexidade e baixo custo para serem empregadas de forma rotineira na

identificação de híbridos em pisciculturas e no monitoramento genético das espécies no ambiente natural.

O PCR multiplex apresentou algumas vantagens quando comparado com o PCR RFLP, pois não requer passos adicionais de restrição enzimática, eliminando tempo e custos associados à compra de enzimas. Porém, podem ocorrer algumas dificuldades e limitações quanto ao desenho dos *primers*, comprometendo a especificidade e eficácia das amplificações. De qualquer forma, ambas as metodologias são eficientes na identificação dos híbridos entre pintado e cachara e podem ser aplicadas de acordo com a disponibilidade de tempo e reagentes.

O passo seguinte foi relacionado à aplicação destes marcadores em amostras das espécies capturadas no ambiente natural. Foram observados indícios de mistura de espécies naturais e híbridos na natureza, com a verificação da ocorrência dos híbridos “pintachara” e “cachapinta” em amostras provenientes dos rios Paraguai, MS (bacia do Paraguai) e Mogi-Guaçu, SP (bacia do Alto Paraná). Deve ser considerado que os híbridos encontrados poderiam ser resultantes de cruzamentos naturais entre as espécies, quando vivendo em simpatria em ambientes como o Rio Paraguai, assim como também de introduções e/o escapes de pisciculturas ou “pesque-pagues” existentes nestas regiões, onde grandes empreendimentos estão voltados à produção artificial de híbridos entre estas espécies. Por outro lado, em ambientes como no Rio Mogi Guaçu, apenas o pintado, *P. corruscans* tem sua ocorrência confirmada, não existindo referências sobre a presença da cachara. A presença de híbridos primários, possivelmente de geração F₁, caracterizados pelos marcadores moleculares, além de evidenciarem uma origem possivelmente recente, dão indicações de que, neste ambiente, a existência das formas híbridas identificadas deve-se possivelmente a escapes ou à ação eventual de introdução de

peixes produzidos em pisciculturas. Estes dados indicam que os resultados previstos para a prática sem controle da hibridação artificial em peixes são reais e que já é possível detectar a mistura de produtos de piscicultura nos ambientes naturais. Os impactos destas atividades no ambiente são de difícil previsão e vão depender principalmente da adaptação e viabilidade destes híbridos e da sua capacidade de se reproduzir na natureza.

O presente trabalho representa, portanto, o primeiro estudo genético sobre os híbridos “pintachara” e “cachapinta”, fornecendo informações genéticas a respeito destes híbridos e das espécies parentais, assim como estabelecendo marcadores moleculares eficazes para a sua identificação. A verificação da ocorrência da mistura de formas híbridas com as espécies parentais *P. corruscans* e *P. reticulatum* em ambientes da sua ocorrência, reafirma a necessidade de uma fiscalização e controle dos estabelecimentos relacionados à produção e comercialização destes produtos híbridos, assim como no monitoramento das espécies no ambiente natural, a fim de realizar uma produção e manejo adequados destes híbridos e também proteger e conservar as espécies nativas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados das análises citogenéticas e moleculares realizadas em exemplares das espécies de peixes *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), bem como dos híbridos interespecíficos “pintachara” e “cachapinta” permitiram concluir que:

- 1** – Os dados citogenéticos obtidos neste trabalho representam a primeira caracterização cromossômica dos híbridos “pintachara” (resultante do cruzamento entre fêmea de pintado x macho de cachara) e “cachapinta” (resultante do cruzamento entre fêmea de cachara x macho de pintado), e indicam que estes animais são híbridos diplóides simples e mantêm os mesmos padrões cariotípicos observados para seus parentais, não sendo, portanto, identificados através das técnicas citogenéticas utilizadas;
- 2** – As análises moleculares realizadas com a aplicação das técnicas de PCR-RFLP e PCR multiplex envolvendo regiões do gene nuclear RAG2 e do gene mitocondrial 16S, demonstraram diferentes padrões eletroforéticos entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*, diferenciando estas espécies de modo efetivo e constituindo-se em marcadores genéticos espécie-específicos.
- 3** – A análise do gene nuclear possibilitou a identificação dos híbridos interespecíficos através de um padrão eletroforético heterozigótico, com bandas diagnósticas herdadas de ambos os parentais. Já o gene mitocondrial permitiu a distinção dos híbridos “pintachara” e “cachapinta” entre si, através da identificação dos seus parentais maternos.

4 – A aplicação dos marcadores moleculares obtidos neste trabalho em exemplares da natureza indicou a ocorrência dos híbridos “pintachara” e “cachapinta” nas amostras analisadas provenientes dos Rios Paraguai, MS (bacia do Paraguai) e Mogi-Guaçu, SP (Bacia do Alto Paraná), a qual foi considerada devida a escapes e/ou a eventuais introduções de híbridos nestes ambientes, indicando que os resultados previstos para a prática sem controle da hibridação artificial em peixes são reais e que já é possível detectar a mistura de produtos de piscicultura nos ambientes naturais.

5 – Pela sua eficiência, aplicabilidade e rapidez de execução, os métodos moleculares desenvolvidos no presente trabalho apresentam potencial para serem utilizados de forma rotineira no monitoramento e fiscalização da produção de híbridos em estabelecimentos relacionados à reprodução e comercialização de peixes, com o objetivo de delinear planos de conservação biológica e de manejo adequado dos estoques naturais e cultivados.

6 REFERÊNCIAS

- Abd-El-Haleem D, Kheiralla ZH, Zaki S, Rushdy AA e Abd-El-Rahiem W (2003) Multiplex-PCR and PCR-RFLP assays to monitor water quality against pathogenic bacteria. *J. Environ. Monit*, 5: 865–870.
- Akasaki T, Yanagimoto T, Yamakami K, Tomonaga H e Sato S (2006) Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome *b* gene in Cod Fish (Order *Gadiformes*) Products. *Journal of Food Science*, 71 (3): 190-195.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P e Wenburg JK (2001) The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology e Evolution*, 16 (11): 613-622.
- Almeida-Toledo LF, Bigoni APV, Bernardino G e Toledo-Filho SA (1995) Chromosomal location of Nors and C bands in F₁ hybrids of bighead carp and silver carp reared in Brazil. *Aquaculture*, 135: 277-284.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA, Bernardino G, Ferrari VA e Alcantara RCG (1987) Cytogenetic studies in *C. mitrei*, *C. macropomum* and their interspecific hybrid. In: *Selection, Hybridization and Genetic Engeneering in Aquaculture*, ed. K. Tiews, Berlin Heenemann Verlagsgesellschaft mb II, 1: 189-195.
- Apostolidis AP, Apostolou PK, Georgiadis A e Sandaltzopoulos R (2007) Rapid identification of *Salmo trutta* lineages by multiplex PCR utilizing primers tailored to discriminate single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the mitochondrial control region. *Conserv. Genet*, 8: 1025–1028.
- Aranishi F (2005) PCR-RFLP Analysis of Nuclear Nontranscribed Spacer for Mackerel Species Identification. *J. Agric. Food Chem*, 53 (3): 508-511.

- Arnold ML e Hodges SA (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Tree*, 10 (2): 67-71.
- Avise JC (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. London*, 42: 312-325.
- Barker CS, Cipriano F e Palumbi SR (1996). Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology*, 5: 671-685
- Bartley, DM, Rana K e Immink AJ (2001) The use of hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 325-337.
- Bernardino G, Mendonça JOJ, Ribeiro LP, Alcantara RCG, Ferrari VA e Fijan N (1986) Primeira reprodução do tambacu; um híbrido do gênero *Colossoma*. In: *Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero Colossoma*. (Projeto Aqüicultura/Brasil 3-7-76-0001-CIID), CEPTA, Pirassununga, 11-12.
- Bigoni, APV; Almeida-Toledo, LF e Toledo Filho, SA (1992) Estudos citogenéticos em *Pseudoplatystoma coruscans* (Pimelodidae, Sorubiminae) do rio Mogi Guaçu, SP. In: *Anais IV Simp. Citog. Evol. Aplic. Peixes Neotropicais*, 32.
- Boecklen WJ e Howard DJ (1997) Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, 78: 2611-2616.
- Borin LA e Martins-Santos IC (2004) Study on karyotype and occurrence of B chromosomes in two endemic species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from the river Iguaçu. *Hereditas*, 140: 201-209.
- Brinn MNA, Porto JIR e Feldberg E (2004) Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. *Hereditas*, 141: 252-257.

- Britski H A (1972) Peixes de água doce do Estado de São Paulo-Sistemática. In: *Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Paraguai ed. Poluição e Piscicultura*. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e Instituto de Pesca, 79-108.
- Britski HA, Sato, Y e Rosa, ABS (1984) *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*. Câmara dos deputados/ CODEVASF, Brasília.
- Buitrago-Suárez UA and Burr BM (2007) Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Blecker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512 (1): 1-38.
- Carrera E, Garcia T, Céspedes A, González I, Fernandez A, Hernandez PE e Martin R (1999) Salmon and Trout Analysis by PCR-RFLP for Identity Authentication. *Journal of Food Science*, 64 (3): 410-413.
- Carvalho RA e Dias AL (2005) Karyotypic characterization of *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae): C-, G- and restriction endonuclease banding. *Genetics and Molecular Research*, 4 (4): 663-667.
- Carvalho RA e Dias AL (2007) Interindividual size heteromorphism of NOR and chromosomal location of 5S rRNA genes in *Iheringichthys labrosus*. *Braz. arch. biol. Technol*, 50 (1): 141-146.
- Castro J, Sánchez L e Martínez P (1998) Analysis of the NOR size variants in Brown Trout (*Salmo trutta*) *The Journal of Heredity*, 89: 264-266.
- Catella AC (2004) Situação atual e perspectivas para o uso dos recursos pesqueiros do pantanal. In: *IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal*. Corumbá/MS.
- DOI: cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/palestras/Catella.PDF

- Chapman DD, Abercrombie DL, Douady CJ, Pikitch EK, Stanhope MJ e Shivji MS (2003) A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the greatwhite shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics*, 4: 415–425.
- Chevassus B (1983) Hybridization in fish. *Aquaculture*, 3: 254-262.
- Cocolin L, D'Agaro E, Manzano M, Lanari D e Comi G (2000) Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (Seabass, Seabream, Umbrine, and Dentex). *Journal of Food Science*, 65(8): 1315-1317.
- Cole CJ e Leavens CR (1971) Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetol*, 49: 102, 1971.
- Dias AL e Foresti F (1993) Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). *Rev. Bras. Genet*, 16: 585-600.
- Durica DS e Krider HM (1978) Studies on the ribosomal RNA cistrons in *Drosophila* hybrids. II. Heterochromatic regions mediating nucleolar dominance. *Genetics*, 89: 37–64.
- Einum S e Fleming IA (1997). Genetic divergence and interactions in the wild among native, farmed and hybrid Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*. 50: 634–651.
- Epifanio e Philipp (2001) Simulating the extinction of parental lineages from introgressive hybridization: the effects of fitness, initial proportions of parental taxa, and mate choice. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10:339-354.
- Epifanio J e Nielsen J (2001) The Role of Hybridization in the Distribution, Conservation and Management of Aquatic Species. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 245–251.

- FAO (2008) The State of World Fisheries and Aquaculture – 2006 (SOFIA). *Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO Fisheries and Aquaculture Department*, Roma.
- Faustino F, Nakaghi LSO, Marques C, Ganeko LN e Makino LC (2009) Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. hybrids. *International Journal Developmental Biol.* [In Press] DOI 10.1387/ijdb.082826ff.
- Fenocchio AS (1993) Cromossomos supranumerários no gênero *Rhamdia* (Pisces): *Caracterização cromossômica e considerações sobre a evolução cariotípica nos Siluroidei*. Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- Fenocchio AS e Bertollo LAC (1992) Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios*, 69: 41-46.
- Ferguson A e Thorpe JE (1991) Biochemical Genetics and Taxonomy of Fish. FSBI Symposium. *Journal of Fish Biology*, 39 (A suppl): 1-357.
- Fernandes R, Gomes LC e Agostinho AA (2003) Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, 25(1): 115-120.
- Ferraris CJ Jr (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418, 628 p.
- Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, (EMBRAPACENARGEN Documento 20). 220 p.
- Finizio AD, Guerriero G, Russo GL e Ciarcia G (2007) Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by sequencing and PCR–RFLP analysis of

mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. *Eur Food Res Technol*, 225:337–344

Foresti F, Senhorini, JA, Almeida-Toledo LF, Oliveira C, Porto-Foresti F, Silva MFZD e Calcagnotto D (2007) Análise citogenética e genético-molecular das populações de *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon hilarii*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus lineatus* e *Leporinus macrocephalus* dos rios Miranda, Aquidauana, Paraguai (MS), Cuiabá/Manso e do Parque Nacional do Pantanal Mato-Grossense (MT). In: *Pesquisas patológicas e genéticas em recursos pesqueiros da bacia do Alto Paraguai*. Ministério do Meio Ambiente, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros, Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais. 2: 128-164.

Foresti, F; Almeida-Toledo, LF e Toledo-Filho, SA (1981) Polymorphic nature of nucleous organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet*, 31: 137-144.

Garcia C e Moreira-Filho O (2005) Cytogenetical analyses in three fish species of the genus *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus. *Neotropical Ichthyology*, 3 (2): 285-290.

Garcia C e Moreira-Filho O (2008) Localization of ribosomal genes in three *Pimelodus* species (Siluriformes, Pimelodidae) of the São Francisco River: 5S genes as species markers and conservation of the 18S rDNA sites. *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1 -suppl): 261-264.

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

- Gold JR, Li Y, Schmidt TR e Tave D (1991) Nucleolar dominance in interspecific hybrids of cyprinid fishes. *Cytobios*, 65: 139-147.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Series*, 41: 95-98.
- Hashimoto DT, Laudicina A, Bortolozzi J, Foresti F e Porto-Foresti F (2009b) Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Genetica*, <DOI 10.1007/s10709-009-9366-y>.
- Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Bortolozzi J, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F (2009c) Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture*, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.015.
- Hashimoto DT, Parise-Maltempi PP, Laudicina A, Bortolozzi J, Senhorini JA, Foresti F e Porto-Foresti F (2009a) Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytogenet Genome Res*, 124:151–157.
- 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.
- Howell WM (1977) Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62: 361-367.

- Howell WM e Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Hubbs CL (1955) Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology*, 4: 1-20.
- Hubbs CL (1961) Isolating mechanisms in the speciation of fishes. In W. F. Blair (org.) *Vertebrate Speciation*, Austin, Univ. of Texas Press.
- Hulata G (2001) Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155–173.
- Huxel GR (1999) Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation*, 89:143-152.
- Innes BH, Grewe PM e Warda RD (1998) PCR-based genetic identification of marlin and other billfish. *Mar. Freshwater Res.*, 49, 383–388.
- Inoue LAKA, Cecarelli PS, Senhorini JA (2003) A larvicultura e a alevinagem do pintado e da cachara. *Revista Panorama da Aqüicultura*, 13 (76): 15-21.
- Jordan G (1987) At the heart of the nucleolus. *Nature*. 329: 489-490.
- Kirtiklis, L e Jankun M (2006) Chromosome analysis in coregonid individuals in the interspecific hybridization zone. *J. Appl. Ichthyol.*, 22:401-403.
- Lee MR e Elder FFB (1980) Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogen. Cell Genet*, 26: 36-40.
- LeGrande WH (1981) Chromosomal Evolution in North American Catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) with Particular Emphasis on the Madtoms, *Noturus*. *Copeia*, 1: 33-52.
- Levan A, Fredga K e Sandbreg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

- Liu ZJ e Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1–37.
- Lozano R, Rejon CR e Rejon MR (1988) A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. *Stain Technology*, 66 (6): 335-338.
- Lundberg JG and Littmann MW (2003) Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis, R., Kullander, S.O. e Ferraris, C.J. Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, 432–455.
- Magnussen JE, Pikitch EK, Clarke SC, Nicholson C, Hoelzel AR e Shivji MS (2007) Genetic tracking of basking shark products in international trade. *Animal Conservation*, 10: 199–207.
- Manosroi J, Petchjul K, Mevatee U e Manosroi A (2003) Karyotype analysis of the hybrid, Thai Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn. X *Oreochromis mossambicus* Linn.). *OnLine Journal of Biological Sciences*, 3 (7):612-617.
- Markoulatos P, Siafakas N e Moncany M (2002) Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *J. Clinical Lab. Analysis*, 16: 47–51.
- Marques MBA, Moreira-Filho O, Garcia C e Margarido VP (2008) Cytogenetic analyses of two endemic fish species from the São Francisco River basin: *Conorhynchus conirostris* and *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1 -suppl): 215-221.
- Marshall HD, Johnstone KA e Carr SM (2007) Species-specific oligonucleotides and multiplex PCR for forensic discrimination of two species of scallops, *Placopecten magellanicus* and *Chlamys islandica*. *Forensic Science International*, 167: 1–7.

- Martins C e Galetti Jr. PM (2001) Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes?. *Genética*, 111. 439–446.
- Martins-Santos IC, Júlio-Jr HF e Burin I (1996). Karyotypic studies of four species of Sorubiminae subfamily (Pisces, Siluriformes). *Caryologia*, 49: 73-80.
- Matondo BN, Nlemvo AB, Ovidio M, Poncin P e Phippart JC (2007) Fertility in first-generation hybrids of roach, *Rutilus rutilus* (L.), and silver bream, *Blicca bjoerkna* (L.). *J. Appl. Ichthyol.*, 24:1-5.
- Mayr E (1963) The breakdown of isolating mechanisms (hybridization). In: E. Mayr. *Animal species and evolution*, Belknap Press, Cambridge, MA, 110-135.
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF e Foresti F (2009) Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Molecular Ecology Resources*, 9: 771–773.
- Miranda MOT (1997) Surubim Belo Horizonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Coleção Meio Ambiente. *Série Estudos de Pesca*, 19: 156p.
- Moritz C, Dowling TE e Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-292.
- Muhlfeld CC, Clint C, McMahon TE, Belcer D, Kershner JL (2009) Spatial and temporal spawning dynamics of native westslope cutthroat trout, *Oncorhynchus clarkii lewisi*, introduced rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and their hybrids. [*Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*](#), 66(7):1153-1168.
- Nelson SJ (1976) *Fishes of the world*. Wiley- Interscience Publication. New York, 416 p.

- Nelson SJ (1994) *Fishes of the world*. 3rd ed. United State of America. Ed. John Wiley e Sons. 600 p.
- Nikolukin N I (1946). Experimental progeny obtained from intergeneric hybrids of Cyprinidae. *Comp. Rend. (Dokl.) Acad. USSR*, 51: 737–740.
- Oliveira C e Gosztanyi AE (2000) A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion os chromosome evolution in Siluriforms. *Caryologia*, 53 (1): 31-37.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F e Toledo-Filho SA (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227-236.
- Orsi LM e Agostinho AA (1999) Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16 (2): 557-560.
- Padhi BK e Mandal RK (1997) Inadvertent hybridization in a carp hatchery as detected by nuclear DNA RFLP. *Journal of Fish Biology*, 50: 906–909.
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis D, Moritz C e Mable B (Eds.), *Molecular Systematics*, Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Park I, Janku S, Nam K, Douglas SE, Hohnson SC e Kim DS (2003) Genetic characterization, morphometrics and gonad development of induced interspecific hybrids between yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* (Storer) and winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 34: 389-396.

- Pendás AM, Morán P, Freije JP, Garcia-Vásquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two *tandem* repeats of *Atlantic salmon* 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.*, 67:31-36.
- Perez J, Martinez JL, Morant P, Beall e Garcia-Vazquez E (1999) Identification of Atlantic salmon X brown trout hybrids with a nuclear marker useful for evolutionary studies. *Journal of Fish Biology*, 54:460-464.
- Porto-Foresti F (2001) Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, 119 p.
- Porto-Foresti F e Foresti F (2004) Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. *TecArt, São Paulo*, 195-215.
- Porto-Foresti F, Andreatta AA, Oliveira C e Foresti F (2000) The Karyotype of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes) from the Rio Paraguay basin. *Chromosome Science*, 4. 99-102.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Alves AL, Almeida RBC, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F (2008) Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1 suppl): 195-202.
- Porto-Foresti F, Oliveira C, Tabata YA, Rigolino MG e Foresti (2002) NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Hereditas*, 136: 227–230.
- Reeder RH e Roan JG (1984) The mechanism of nucleolar dominance in *Xenopus* hybrids. *Cell.*, 38: 39–44.

- Rhymer J.M. e Simberloff D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 27: 83–109.
- Rosenfield JA, Todd T e Greil R (2000) Asymmetric hybridization and introgression between pink salmon and chinook salmon in the Laurentian Great Lakes. *Trans. of the Am. Fish. Soc.*, 129: 670-679.
- Schweizer D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, v.58, p. 307-324, 1976.
- Scribner KT, Page KS e Bartron ML (2001) Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 293–323.
- Southern EM (1976) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503–517.
- Souza AB, Fonseca CG, Ribeiro LP e Pinheiro LEL (1997) Análise cromossômica do surubim *Pseudoplatystoma coruscans* das bacias dos rios São Francisco e Paraguai. In: *Surubim* (ed. Miranda, M.O.T.), IBAMA, Belo Horizonte, 57-68.
- Souza AB, Swarça AC e Dias AL (2004) Analyses of the nucleolus organizer region of *Pimelodus* (Siluriformes, Pimelodidae) using AgNO₃, CMA₃ and FISH with 18S rDNA probe. *Caryologia*, 57 (4): 145-151.
- Sterba, G (1973) *Freshwater fishes of the world*. THF publications, USA, 877 p.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell. Res.*, 75: 304-306.
- Swarça AC, Caetano LG e Dias AL (2000) Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, 23 (3): 589-593.

- Swarça AC, Cestari MM, Giuliano-Caetano L e Dias AL (2001b) Cytogenetic characterization of the large South American Siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). *Chromosome Science*, 5: 51-55.
- Swarça AC, Giuliano-Caetano L e Dias AL (2001a) Analyses of nucleolus organizer regions and heterochromatin of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Genética*, 110: 97-100.
- Swarça. AC, Fenocchio AS, Cestari MM e Dias LA (2005) Karyotype divergence among populations of giant catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Pimelodidae) indicates higher species diversity. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 16 (4): 325-330.
- Swarça. AC, Fenocchio AS, Cestari MM e Dias LA (2008) Analyses of the Structure of NORs in Two Species of South American Sorubiminae Fishes (Siluriformes) by Means of Several Cytogenetic Techniques. *Folia biologica* (Kraków), 56:31-35.
- Swarça. AC, Fenocchio AS, Cestari MM, Bertollo LAC e Dias LA (2006) Heteromorphic sex chromosome system with an exceptionally large Y chromosome in a catfish *Steindachneridion* sp. (Pimelodidae). *Cytogenet Genome Res.*, 112:325-328.
- Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fisheries*. <DOI 10.1007/s11160-009-9107-4 >.
- Thompson JD, Higgins DG e Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.

- Thorgaard G.H. e Allendorf F.W. (1988) Developmental genetics in fishes. *In*: Malacinski G.M. (ed.), *Developmental Genetics of animals and Plants*. MacMillan, New York, 369–391.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Bernardino G e Calcagnotto D (1994) Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. *Cadernos de Ictiogenética 2*, CCS/USP, São Paulo.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Calcagnotto D, Santos SBAF e Bernardino G (1998) Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética 4*, CCS/USP, São Paulo.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Galhardo E e Donola E (1992) Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. *Cadernos de Ictiogenética 1*, CCS/USP, São Paulo.
- Toledo-Filho SA, Calcagnotto D, Bernardino G, Fernandes-Matioli FMC, Moysés CB, Almeida-Toledo LF e Foresti F (1999) Projeto de bancos genéticos na piscicultura brasileira. *Cadernos de Ictiogenética 5*, CCS/USP, São Paulo.
- Toledo-Filho SA, Foresti F e Almeida-Toledo LF (1996) Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética 3*, CCS/USP, São Paulo.
- Trotta M, Schonhuth S, Pepe T, Cortesi ML, Puyet A e Bautista JM (2007) Multiplex PCR method for use in Real-Time PCR for identification of fish fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and common substitute species. *J. Agric. Food Chem*, 53: 2039-2045.
- Vasconcelos C e Martins-Santos IC (2000) Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). *Hereditas*, 132: 103-109

- Vidotto AP, Swarça AC, Fenocchio AS e Dias AL (2004) Cytogenetics studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi river basin. *Journal of Heredity*, 95 (6): 517-520.
- Vincze T, Posfai J e Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.*, 31: 3688-3691.
- Vissoto PC, Foresti F e Oliveira C (1999) Supernumerary chromosomes in two species of the family Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). *Chrom. Science*, 3: 9-13.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*, 420: 191–201.
- Wolf C, Burgener M, Hubner P e Luthy J (2000) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Labensm. -Wiss. -Technol.*, 33: 144-150.
- Young WP, Ostberg CO, Keim P e Thorgaard GH (2001) Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*) *Molecular Ecology*, 10: 921–930.