

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP CÂMPUS
DE BAURU - FACULDADE DE CIÊNCIAS

INVASÃO BIOLÓGICA DE BAGRES HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E
Pseudoplatystoma reticulatum NO ALTO RIO PARANÁ: UMA DETECÇÃO VIA MARCADORES
MOLECULARES DIAGNÓSTICOS.

Mel Ayumi Tamada-Silva

Bauru - SP
2026

Mel Ayumi Tamada-Silva

**INVASÃO BIOLÓGICA DE BAGRES HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E
Pseudoplatystoma reticulatum NO ALTO RIO PARANÁ: UMA DETECÇÃO VIA MARCADORES
MOLECULARES DIAGNÓSTICOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências - Bauru, para a Defesa de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biociências
Área de Concentração: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica.
Orientador: Prof. Assoc. Fabio Porto-Foresti

Bauru - SP

2026

T153i

Tamada-Silva, Mel Ayumi

INVASÃO BIOLÓGICA DE BAGRES HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E
Pseudoplatystoma reticulatum NO ALTO RIO PARANÁ : UMA DETECÇÃO VIA
MARCADORES MOLECULARES DIAGNÓSTICOS. / Mel Ayumi Tamada-Silva. -- Bauru,
2026

61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de
Ciências, Bauru

Orientador: Fabio Porto-Foresti

1. Híbridação. 2. *Pseudoplatystoma*. 3. Piscicultura. 4. Marcadores moleculares. 5.
Invasão biológica. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MEL AYUMI TAMADA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 11 de março de 2026, às 9h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MEL AYUMI TAMADA SILVA, intitulada "MONITORAMENTO

AMBIENTAL DA FREQUÊNCIA DE BAGRES HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E *Pseudoplatystoma reticulatum* NA REGIÃO DO ALTO RIO PARANÁ A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES DIAGNÓSTICOS". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP / Câmpus de Bauru - FC, Professor Doutor MÁRIO LUÍS ORSI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Animal e Vegetal / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, Prof. Dr. DIOGO TERUO

HASHIMOTO (Participação Virtual) do(a) Coordenadoria Executiva - Centro de Aquicultura da Unesp / UNESP / Reitoria - RUNESP, Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou

virtual, a discente recebeu o conceito final: ____ A_p_r_o_v_a_d_o ____ . Nada mais havendo, foi

lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 FABIO PORTO FORESTI
Data: 16/03/2026 10:59:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. FABIO PORTO FORESTI

PROPOSTA DE ALTERAÇÃO DO TÍTULO

A Comissão Examinadora propõe a alteração do título do trabalho da aluna: Mel Ayumi Tamada Silva de “MONITORAMENTO AMBIENTAL DA FREQUÊNCIA DE BAGRES HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E *Pseudoplatystoma reticulatum* NA REGIÃO DO ALTO RIO PARANÁ A PARTIR DE MARCADORES MOLECULARES DIAGNÓSTICOS.”

Para: “INVASÃO BIOLÓGICA DE BAGRES HÍBRIDOS ENTRE *Pseudoplatystoma corruscans* E *Pseudoplatystoma reticulatum* NO ALTO RIO PARANÁ: UMA DETECÇÃO VIA MARCADORES MOLECULARES DIAGNÓSTICOS.”

Bauru, 17 de março de 2026.



Documento assinado digitalmente
FABIO PORTO FORESTI
Data: 17/03/2026 16:13:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^o. Dr^o. Fabio Porto-Foresti
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família por serem meus maiores incentivadores e rede de apoio, mesmo estando longe. Em especial agradeço à minha mãe, Tiemi, por todo o suporte emocional e financeiro, que me permitiram traçar meu caminho de uma forma mais tranquila com dedicação exclusiva. Obrigada por sempre colocar a educação em primeiro lugar e me motivar a ser uma mulher independente. Agradeço ao meu pai, Marcelo, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as minhas decisões, e a minha irmã, Nina, por sempre estar ao meu lado, torcendo por mim e celebrando cada conquista. Sinto falta da presença de vocês no meu dia a dia. Amo vocês com todo meu coração!

Ao meu namorado, Davi. Agradeço pela parceria e cumplicidade. Você mudou completamente o significado de amor para mim, me fez ver que quando encontramos a pessoa certa, a vida se torna mais leve, porque podemos compartilhar cada pedacinho de nossas vidas, celebrando as coisas boas e acolhendo em momentos difíceis. Obrigada por aliviar minhas preocupações e tornar situações simples do dia a dia, como assistir um filme no sofá de casa, em momentos que fico ansiosa para acontecerem. Eu te amo muito, você foi a melhor coisa que já me aconteceu!

Às minhas amigas, Beatriz e Milena. Agradeço por estarem comigo desde o começo da graduação e continuarem me acompanhando até hoje, mesmo com alguns quilômetros de distância agora. À Bibi, agradeço pela parceria incondicional, por todas as conversas, risadas (ela é hilária), simulações se estivéssemos em situações que estamos assistindo, realitys shows no sofá e esfiha libanesa. Melebia para sempre! À Milena, agradeço por sempre ser tão doce, companheira e acolhedora. Sou muito grata ao projeto “Ao Vivo e em Cores” por colocar em minha vida uma pessoa com tanto carinho no coração. Você é luz, Mi! Obrigada por serem lar em Bauru, minhas amigas queridas!

Às minhas amigas, Verônica e Camila, minhas eternas parceiras de laboratório! À Verônica, por sempre se fazer presente, me acompanhando desde compras no mercado até os palcos do teatro municipal. À Camila, por ser tão acolhedora e estar sempre disposta a ajudar. Sou muito grata por ter na molecular pesquisadoras tão incríveis para me ensinar e auxiliar nos meus primeiros dias. Vocês são meus exemplos!

Ao meu orientador, Fabio Porto-Foresti. Agradeço pela oportunidade de me desenvolver como pesquisadora sob uma orientação tão tranquila, com muita conversa, troca e confiança. Obrigada por sempre ser tão compreensível e permitir que a pós-graduação corresse, na maneira do possível, de forma mais branda. Seus conselhos e ensinamentos vão para além de uma bancada, por isso te tenho como exemplo de pesquisador e pessoa.

Aos meus colegas do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE), em especial, Vitor, Frankin e Copin, meus parceiros nos peixes híbridos. Obrigada por quebrarem a cabeça comigo nas complicações da PCR multiplex e sempre estarem dispostos a me ajudar. A companhia de vocês faz o dia a dia do laboratório mais descontraído e divertido. Um agradecimento a parte para minha amiga, Copin, por ser minha companhia diária e me fazer dar tanta risada! O laboratório fica mais leve com você. À todos os meus companheiros de laboratório, agradeço por cada colaboração e suporte durante esses 4 anos de laboratório.

À minha banca de qualificação, Dra. Fernanda Dotti do Prado e Dr. Eduardo Brambilla, agradeço por aceitarem ler meu trabalho e fazerem contribuições tão necessárias. À Fer, um agradecimento

especial por ter me dado tanto auxílio durante todo meu mestrado, sempre disposta a me ensinar e sanar minhas dúvidas.

À minha banca de defesa, Dr. Diogo Hashimoto e Dr. Mário Orsi, agradeço por terem tirado um tempo para lerem meu trabalho e fazerem contribuições. Tenho certeza que com o conhecimento de vocês, o trabalho ficará mais robusto.

Ao CEPTA/ICMBio, pela parceria no projeto Pró-Pardo e disponibilização das amostras para análise. Obrigada por viabilizarem minha pesquisa e confiarem no meu trabalho!

À Fundação Espírito-santense de Tecnologia – FEST pelo bolsa concedida nos meses iniciais do meu mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela formação concedida e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo financiamento do meu projeto de pesquisa.

RESUMO

O desenvolvimento do setor aquícola tem relação direta com o mercado consumidor de pescados, que tem crescido nos últimos anos, e impulsionado os produtores a buscarem por métodos de produção e melhoramento para seus investimentos. Nesse contexto, a técnica de hibridação em peixes foi implementada no Brasil na década de 1970, como alternativa para uma produção mais rápida, eficiente e com produtos capazes de reunir as melhores características de diferentes espécies, que agradam tanto o produtor quanto para o consumidor, por intermédio do cruzamento interespecífico. As particularidades que oferecem vantagens para os híbridos sobre as espécies parentais puras, do ponto de vista ambiental, são observadas como potenciais riscos para a ecologia local e integridade genética, portanto, em condições ideais, esses indivíduos deveriam ficar isolados do meio externo. O manejo inadequado, na maioria das instalações beira rio, posiciona a piscicultura como principal dispersora de híbridos e espécies exóticas em novos ambientes, tornando realidade as ameaças às populações naturais e seus respectivos perfis genéticos. Por causarem danos irreversíveis à integridade genética das espécies, é de extrema importância ter conhecimento do cenário dos locais afetados pela presença híbrida e a situação dos estoques naturais. No presente estudo foram analisadas amostras de 3 rios do Alto rio Paraná, os rios Grande, Pardo e Mogi-guaçu, com o intuito de compor o Plano de Ação Nacional do Alto rio Paraná (PAN Alto Paraná), por meio do levantamento da frequência do híbrido *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) X *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), o qual afeta diretamente uma das espécies parentais, o *P. corruscans*, já categorizado no estado de vulnerabilidade. A diferenciação entre as espécies puras e os híbridos foi realizada a partir da aplicação de 4 marcadores moleculares, sendo eles: *RAG2* (*Recombination activating gene 2*), *GLOBINA* (β globina), *EF1- α* (*Nuclear elongation factor*) e *Prt36* (marcador microsatélite), e um marcador mitocondrial, o 16S. As identificações revelaram a presença majoritária de espécimes híbridos da linhagem avançada (pós-F1), isto é, fruto do cruzamento entre híbridos ou retrocruzamentos. Das 78 amostras analisadas, aproximadamente 77% representaram os híbridos pós-F1, 14% *P. corruscans* e 9% *P. reticulatum*. Com os dados obtidos, foi possível verificar a situação preocupante dos estoques naturais de *P. corruscans*, que se mostraram em declínio, e os sinais avançados de introgressão genética, fenômeno que atinge a integridade genética das espécies e, em casos mais graves, levar à extinção genética.

Palavras chave: hibridação, Pseudoplatystoma, marcadores moleculares, piscicultura.

ABSTRACT

The development of the aquaculture sector is directly related to the consumer market for fish, which has grown in recent years and driven producers to seek production methods and improvement strategies for their investments. In this context, hybridization techniques were implemented in Brazil in the 1970s as an alternative for faster and more efficient production, generating products capable of combining desirable traits from different species, thus appealing to both producers and consumers through interspecific crosses. The characteristics that provide advantages to hybrids over pure parental species, from an environmental perspective, are recognized as potential risks to local ecology and genetic integrity; therefore, under ideal conditions, these individuals should be kept isolated from the natural environment. Inadequate management practices, common in most riverbank aquaculture facilities, position fish farming as a major source of hybrid and exotic species dispersal into new environments, turning the threats to natural populations and their respective genetic profiles into a tangible reality. Because these hybrids can cause irreversible damage to the genetic integrity of species, understanding the conditions of affected areas and the status of natural stocks is of utmost importance. In the present study, samples from three rivers of the Upper Paraná Basin—Grande, Pardo, and Mogi-Guaçu—were analyzed with the aim of contributing to the National Action Plan for the Upper Paraná River Basin (PAN Alto Paraná), through the assessment of the frequency of the hybrid *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) X *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), which directly affects one of the parental species, *P. corruscans*, already classified as vulnerable. Differentiation between pure species and hybrids was performed using four nuclear molecular markers—RAG2 (Recombination activating gene 2), GLOBINA (β -globin), EF1- α (Nuclear elongation factor), and Prt36 (microsatellite marker), as well as one mitochondrial marker, 16S. The identifications revealed a predominance of advanced-generation hybrid specimens (post-F1), that is, individuals resulting from hybrid $\times$ hybrid crosses or backcrosses. Of the 78 samples analyzed, approximately 77% corresponded to post-F1 hybrids, 14% to *P. corruscans*, and 9% to *P. reticulatum*. The data obtained allowed the identification of a concerning scenario for *P. corruscans* natural stocks, which exhibited signs of decline, in addition to clear evidence of advanced genetic introgression—a phenomenon that compromises species' genetic integrity and, in more severe cases, can lead to genetic extinction.

Key-words: hybridization, Pseudoplatystoma, molecular markers, pisciculture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Panorama atual da piscicultura	8
1.1.1 Técnica de hibridação na piscicultura.....	9
1.1.2 Produção de híbridos em pisciculturas brasileiras	10
1.2 Riscos ligados a hibridação.....	12
1.2.1 Contaminação de estoques de cultivo	13
1.2.2 Invasão biológica de híbridos na natureza	14
1.3 Considerações sobre as espécies neotropicais <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> e <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>.....	15
1.3.1 Conservação da espécie <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	17
1.4 Ferramentas para o monitoramento genético aplicado à conservação	20
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Amostragem do material biológico.....	24
3.2 Extração de DNA	26
3.3 Amplificação dos marcadores diagnósticos.....	28
3.3.1 Genes nucleares.....	29
3.3.2 Gene mitocondrial	30
3.3.3 Microsatélites.....	31
3.4 Avaliação de híbridos e introgressão por marcadores moleculares.....	32
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO	38
5.1 Levantamento bibliográfico de detecções de híbridos no Alto rio Paraná	38
5.2 Híbridos avançados e introgressão genética	42
5.3 Queda populacional nos estoques naturais de <i>P. corruscans</i>	44
5.4 Perspectivas das populações híbridas.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7 REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama atual da piscicultura

No ano de 2022 produtos oriundos da pesca e aquicultura atingiram um novo marco histórico, superando 2020, de 232.2 milhões de toneladas acumuladas, segundo o relatório estatístico *State of the World Fisheries and Aquaculture* (SOFIA) 2024, divulgado pela *Food and Agriculture of the United Nations* (FAO). No volume total constam 185.4 milhões de toneladas de animais aquáticos e 37.8 milhões de toneladas de algas (FAO, 2024), dos quais mais de 165 milhões, aproximadamente 89% da produção de animais aquáticos, foi destinada ao consumo humano direto (FAO, 2024). Esse mesmo relatório, aponta ainda que pela primeira vez a aquicultura superou a pesca de captura em relação ao volume total acumulado, indicando que a aquicultura está em período de crescimento, enquanto a pesca se mantém estável.

A situação em que se encontram esses modos de produção é consequência dos programas de melhoramento eficientes que contribuem para o desenvolvimento da piscicultura (Turra *et al.*, 2013). O Brasil destaca-se nesse cenário por apresentar condições ambientais favoráveis, como clima propício, abundância de recursos hídricos e diversidade de espécies nativas com potencial aquícola, esses fatores conferem ao país uma posição de destaque na produção de peixes de água doce na América Latina (Valladão, Gallani & Pilarski, 2018; Garlock *et al.*, 2020; Souto Cavalli *et al.*, 2021). Entre os anos de 2005 e 2015, registrou-se o crescimento significativo de 123% da atividade piscícola brasileira, antes caracterizada como um setor de pequenos empreendimentos e poucos recursos tecnológicos (EMBRAPA, 2017).

O crescimento expressivo do consumo de artigos de pescado vem ocorrendo ano após ano, demonstrando a mudança de hábitos alimentares dos brasileiros (Seafood Brasil, 2021), que impulsiona o setor aquícola a buscar e investir em programas de melhoramento de novas espécies (Hilsdorf *et al.*, 2011).

1.1.1 Técnica de hibridação na piscicultura

As práticas de melhoramento genético são essenciais para sustentar as demandas de mercado, proporcionando o aumento da produtividade e eficiência de diferentes cadeias de produção (Ferreiro, 1998; Doebley *et al.*, 2006). Técnicas como o cruzamento interespecífico têm sido uma das maneiras de produzir, em larga escala, indivíduos com características zootécnicas previamente selecionadas, prática denominada hibridação (Porto-Foresti *et al.*, 2011). De forma mais conceitual, o procedimento é definido pelo cruzamento de dois conjuntos genéticos distintos, cujo resultado são descendentes que exibem, na maioria dos casos, características taxonômicas intermediárias (Mayr, 1963). O objetivo principal da aplicação da prática em pisciculturas é obter animais com melhor desempenho genético, como crescimento mais rápido, resistência a doenças, tolerância às variações de temperatura e salinidade da água e uma melhor qualidade da carne (Bartley *et al.*, 2001; Porto-Foresti *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2025; Huang *et al.*, 2025). Tais fatores favorecem a performance dos híbridos em relação a seus parentais e conferindo a ele a heterose ou vigor híbrido (Porto-Foresti *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2018).

Devido ao destaque nos programas de cultivo de peixe, a produção de híbridos interespecíficos passou a ser uma prática crescente e expressiva nas pisciculturas brasileiras que tem se dedicado à mistura de espécies na busca de produtos mais atrativos ao mercado

da produção comercial e da pesca esportiva (Prado *et al.*, 2011). Além disso, a atual “explosão” na prática de hibridação interespecífica tem relação direta com a emergente necessidade no aumento na produção de peixes. Nesse caso a comercialização de híbridos se mostra como uma alternativa rápida e eficaz para os piscicultores (Porto-Foresti *et al.*, 2011).

No Brasil, a produção de híbridos tem envolvido várias espécies Neotropicais, com destaque para os peixes redondos da família Serrassalmidae e os bagres da família Pimelodidae (Porto-Foresti *et al.*, 2010), populares entre os consumidores.

1.1.2 Produção de híbridos em pisciculturas brasileiras

A produção de híbridos no Brasil teve início no Departamento de Obras Contra a Seca (DNOCS) há quase 40 anos, com a produção de híbridos de tilápia (Toledo-filho *et al.*, 1998). Pouco tempo depois, em 1986, o Centro e Pesquisa de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (CEPTA/ICMBio), localizado em Pirassununga/SP, cruzou a fêmea de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com o macho de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) gerando o híbrido “tambacu” (Bernandino *et al.*, 1986). Esse híbrido apresenta como vantagens a tolerância a baixas temperaturas advinda do pacu e uma alta taxa de crescimento herdada do tambaqui, além de uma carne de excelente qualidade e baixo teor de gordura, aspectos que agradam o mercado consumidor (Alves *et al.*, 2014).

Desde a implantação da prática na década de 1970, certos cruzamentos entre espécies de água doce ganharam popularidade tanto nas pisciculturas quanto entre os consumidores. Podemos destacar seis híbridos amplamente produzidos, sendo eles: tambacu (tambaqui ♀ x pacu ♂), tambatinga (tambaqui ♀ x patinga ♂), cachapinta (cachara ♀ x pintado ♂), pintachara (pintado ♀ x cachara ♂), jundiara (jundiá ♀ x cachara ♂) e pintadiá (pintado ♀ x jundiá ♂) (Alves

et al., 2014). De modo geral, esses indivíduos possuem melhores características zootécnicas de cada espécie parental, ligadas ao crescimento e manejo (Bartley et al., 2000).

As espécies nativas da ordem Siluriformes apresentam grande relevância em programas de melhoramento, principalmente as pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma*, mais especificamente o pintado (*P. corruscans*) (Figura 1a), cachara (*P. reticulatum*) (Figura 1b) e, mais recentemente, pintado-da-amazônia (*P. punctifer*), notáveis por seu grande porte (Moro et al., 2013; Hashimoto et al., 2016). A alta na produção de surubins em cativeiro aconteceu entre os anos de 2010 e 2011, período que coincide com o início da produção comercial de híbridos (Brasil, 2008; Brasil, 2012; IBGE, 2013).

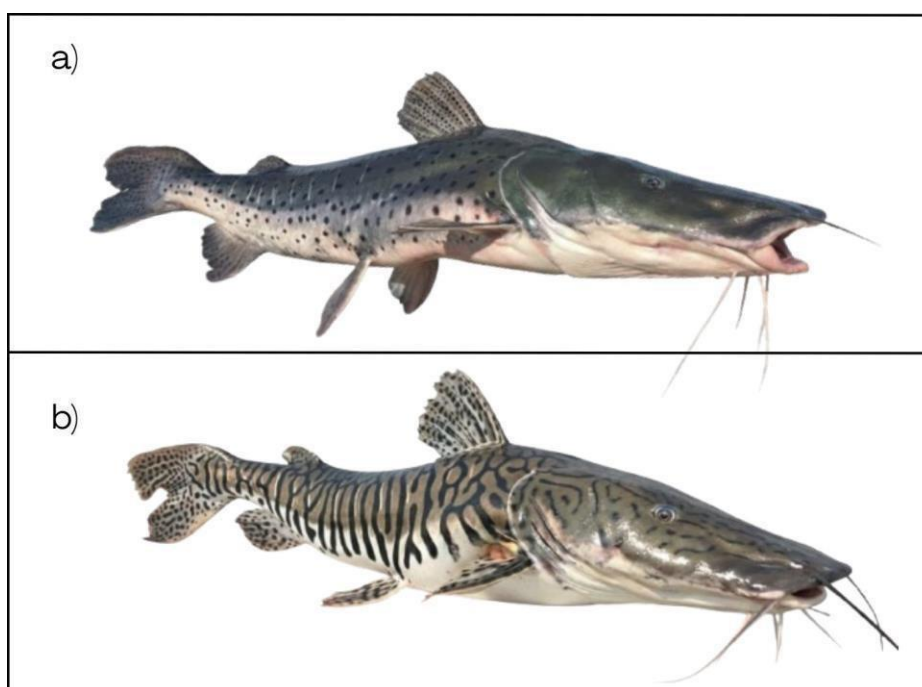


Figura 1: Exemplos das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*. a) *Pseudoplatystoma corruscans* “pintado”, b) *Pseudoplatystoma reticulatum* “cachara”. Fonte: Blog Pesca Gerais.

Os principais híbridos do grupo dos surubins são conhecidos por “cachapinta” (*P. reticulatum* ♀ x *P. corruscans* ♂), “pintachara” ou “ponto e vírgula” (*P. corruscans* ♀ x *P.*

reticulatum ♂) (Carvalho *et al.*, 2007), em virtude do baixo teor de gordura e ausência de espinhos intramusculares (Sato, *et al.*, 1988; Carvalho *et al.*, 2008). Além disso, segundo Pereira *et al.*, 2015, esses híbridos tem alta aceitabilidade na Europa e Estados Unidos devido ao excelente sabor dos files. Apesar da grande importância econômica para a aquicultura brasileira, os híbridos interespecíficos, se manejados erroneamente, podem causar prejuízos para o piscicultor e sérios problemas para o meio ambiente, que refletem em riscos genéticos, como o comprometimento da integridade genética de populações naturais, que pode levar ao declínio e até mesmo extinção de populações naturais (Rhymer *et al.*, 1996; Epifanio & Nielsen, 2001; Hashimoto *et al.*, 2011b; Hirashiki *et al.*, 2021; Curto *et al.*, 2022).

1.2 Riscos ligados a hibridação

Boas práticas de manejo devem acompanhar o processo de hibridação para que, de modo mais sustentável, o piscicultor possa obter seu produto de comercialização sem provocar graves prejuízos ao meio ambiente. No entanto, a rápida popularização da prática resultou em um crescimento descontrolado, com pouco embasamento científico e sem o cuidado adequado para evitar os possíveis riscos ambientais (Porto-Foresti *et al.*, 2011).

Conduitas adequadas de manejo englobam desde a escolha correta da matriz do plantel, que precisam pertencer a linhagens puras para manter a eficiência do cruzamento e evitar a contaminação de estoques de cultivo, até a engorda e armazenamento dos peixes em tanques de rede (Orsi & Agostinho, 1999). Como a maioria das pisciculturas brasileiras estão instaladas nas proximidades de rios e até mesmo dentro de áreas de preservação permanente, garantir o isolamento da produção aquícola com o meio externo é fundamental (Orsi & Agostinho, 1999).

1.2.1 Contaminação de estoques de cultivo

A contaminação dos estoques de cultivo é uma consequência da utilização de espécimes não puras como matriz reprodutora do plantel, que resulta no aumento na taxa de mortalidade e pouca viabilidade dos juvenis (Hashimoto *et al.*, 2011b; Alves *et al.*, 2014). Muitas vezes nessas situações a causa passa despercebida, devido a semelhança morfológica entre as espécies puras e seus híbridos (Hashimoto *et al.*, 2011b).

Hashimoto *et al.*, 2011b, relataram em “Marcadores de DNA no monitoramento de híbridos interespecíficos de peixes” um caso de prestação de serviço em que a aplicação dos marcadores moleculares comprovou a contaminação dos estoques de cultivo da matriz reprodutora de uma piscicultura no estado de São Paulo, que estava passando por prejuízos financeiros decorrente a alta taxa de mortalidade dos indivíduos e baixa viabilidade. O plantel contava com quase 50% de indivíduos pós-F1, que passavam despercebidos pelo piscicultor devido à similaridade entre eles e seus parentais (Figura 2), reforçando a importância do uso de técnicas diagnósticas moleculares para a identificação de híbridos.



Figura 2: Padrão de manchas em *P. corruscans*, *P. reticulatum* e no híbrido “ponto e vírgula”. (a): *Pseudoplatystoma corruscans*, (b): *Pseudoplatystoma reticulatum*, (c): híbrido “ponto e vírgula”. Fonte: Blog Pesca Gerais.

1.2.2 Invasão biológica de híbridos na natureza

O cruzamento espontâneo entre diferentes espécies é considerado para a maioria dos zoólogos como um evento esporádico de baixa frequência, levando em conta que, na maioria dos casos, existem barreiras pré e pós zigóticas, que favorecem um isolamento reprodutivo, espacial, temporal e comportamental entre as diferentes espécies (Mayr, 1963). Dessa forma, temos que a maior parte dos híbridos presentes na natureza são consequências diretas ou indiretas de escapes ou solturas indevidas da piscicultura.

A piscicultura é considerada a principal responsável pela dispersão de indivíduos híbridos e espécies exóticas em novos ambientes (Welcomme 1988; Simberloff *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2023), sendo eles potenciais vetores de bioinvasão, uma ameaça direta a biodiversidade local (Souza *et al.*, 2009; Simberloff *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2022; Nicolosi *et al.*, 2023). Os escapes com a água efluente, o esvaziamento dos tanques durante o manejo, as instalações irregulares e, principalmente, o rompimento ou transbordamento desses em razão de picos de cheias não previstos durante a construção, são as principais vias de introdução de híbridos e espécies exóticas pelas atividades de cultivo (Alves *et al.*, 2014; Sistiaga *et al.*, 2020; Fore & Thorvaldsen, 2021).

Os híbridos, quando em ambientes naturais, são potenciais ameaças para as cadeias tróficas já estabelecidas devido às competições por recurso e locais de desova que surgem com sua introdução (Huxel, 1999; Jensen *et al.*, 2010). De modo geral, esses indivíduos têm o mesmo impacto que as espécies invasoras, modificam a dinâmica local e reduzem a biodiversidade ecológica.

A possibilidade de fixação dos novos organismos inseridos nesses ecossistemas varia bastante e está diretamente ligada ao seu desempenho biológico, expresso pela habilidade de adaptação, pela viabilidade reprodutiva dos híbridos e pelo nível de fertilidade que apresentam (Prado *et al.*, 2011b). Embora possam gerar desequilíbrios ecológicos, os híbridos podem permanecer restritos a determinadas áreas, não se disseminando amplamente devido às limitações genéticas de adaptação das espécies que lhes deram origem (Prado *et al.*, 2011b).

A avaliação da fertilidade dos híbridos é de extrema relevância quando pensamos na conservação de espécies naturais, levando em consideração que com a possibilidade de cruzamentos, os híbridos estabelecidos podem determinar a ocorrência de introgressão genética, a partir de retrocruzamentos que promovem a transferência de genes entre as espécies (Allendorf *et al.*, 2001). Esse fenômeno é capaz de rapidamente reduzir as populações puras das localidades afetadas pelo evento biológico (Huxel, 1999; Muhfeld *et al.*, 2009), e proporcionar um ambiente composto por linhagens híbridas diversas. Na falta de seleção forte contra os genótipos híbridos, a introgressão das populações selvagens irá persistir indefinidamente, mesmo se cessado a introdução desses indivíduos (Prado *et al.*, 2011b).

1.3 Considerações sobre as espécies neotropicais *Pseudoplatystoma corruscans* e

Pseudoplatystoma reticulatum

As espécies *P. corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), o pintado, e *P. reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889), a cachara, são pertencentes à família Pimelodidae e a ordem dos Siluriformes (Lundberg & Littmann, 2003; Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Sua morfologia externa é caracterizada pela ausência de escamas corporais, sendo conhecidos como bagres

de couro, presença de 3 pares de longos barbilhões, nadadeira adiposa bem desenvolvida e manchas escuras no corpo, as quais no *P. corruscans* são representadas por pontos circulares e o *P. reticulatum* listras escuras (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). Ambos são categorizados como peixes de grande porte, entretanto há diferenças entre as espécies, que podem atingir valores aproximados de 140 cm e 40 kg para *P. corruscans*, e de 114 cm e 15 kg para *P. reticulatum* (Resende *et al.*, 1996; Mateus & Penha, 2007).

Destaca-se nessas espécies o comportamento migratório durante o período de reprodução, que começa com o início do período chuvoso e em direção a cabeceira dos rios, entre os meses de outubro e janeiro (Resende, 2003; Godinho *et al.*, 2007). Assim como outros bagres, anualmente realizam dois fluxos migratórios principais: entre fevereiro e setembro os adultos permanecem nos leitos do rio, em outubro iniciam primeira migração rio acima para a reprodução e posteriormente retornam com a segunda migração para a parte baixa do rio principal para se alimentarem (Resende, 2003; Godinho *et al.*, 2007).

Essas espécies atingem a maturidade sexual por volta dos 4 anos e meio de idade, vivendo em torno de 15 anos, e não apresentam cuidado parental com a prole, que permanece nos lagos por algum tempo após sua eclosão (Resende *et al.*, 1996; Resende, 2003; Mateus & Penha, 2007; Godinho *et al.*, 2007). Sua distribuição é endêmica do continente Sul Americano e está nas principais bacias hidrográficas. As espécies podem ser encontradas em simpatria na bacia do Prata, que inclui as bacias do rio Paraguai, Paraná e Uruguai, percorrendo países como o Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Buitrago-Suárez & Burr, 2007). O pintado também é uma espécie residente da bacia do rio São Francisco e cachara na bacia Amazônica, onde é denominada *Pseudoplatystoma fasciatum (lato sensu)* (Lundberg e Littman, 2003; Buitrago-Suárez & Burr, 2007, Carvalho-Costa *et al.*, 2011).

Na região do Alto rio Paraná o pintado é a única espécie nativa do gênero *Pseudplatystoma* (Buitrago-Suárez & Burr, 2007; Bignoto *et al.*, 2009), entretanto, autores como Vaini *et al.*, 2014 já identificaram, por meio de marcadores moleculares, a presença de espécimes adultos de cachara na região, antes limitada ao Baixo rio Paraná. Acredita-se que a introdução seja resultado de ações antrópicas, como a construção do reservatório da barragem de Itaipu, que viabilizou a mistura entre distintas ictiofaunas através no Canal da Piracema (Júlio Júnior *et al.*, 2009; Makrakis *et al.*, 2007) e solturas indevidas por parte da aquicultura (Prado *et al.*, 2011; Vaini *et al.*, 2014).

Conhecidos como predadores, sua nutrição é baseada na ingestão de invertebrados e peixes de menor porte e, conseqüentemente, ocupam um papel ecológico importante de reguladores de cadeia (Resende *et al.*, 1996). Além de sua importância biológica, esses bagres tem grande destaque econômico, sendo apreciados na gastronomia por sua carne com ausência de espinhos intramusculares, e na área esportiva em estabelecimentos como “pesque-pague” e “pesque-solte”, pela reação intensa a fisgada que proporciona confronto entre o peixe e o pescador (Crepaldi *et al.*, 2006; Campos, 2010; Porto-Foresti *et al.* 2010).

1.3.1 Conservação da espécie *Pseudoplatystoma corruscans*

A popularidade das espécies no setor gastronômico, esportivo e artesanal gera uma economia em torno desses indivíduos que começam a ser explorados de forma imprudente e não sustentável. O resultado dessa demanda sob esses pescados é a pesca excessiva desses bagres que, associados com outras alterações antrópicas no ambiente, provocam pressão sobre as espécies e conseqüentemente têm suas populações selvagens reduzidas (Araújo-Lima & Rufino, 2003; Carolsfeld *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2009).

Além da redução dos estoques naturais em razão da exploração excessiva, os *Pseudoplatystoma*, em especial o *P. corruscans*, são prejudicados por alterações na paisagem de seus habitats, como a instalação de barragens que fragmentam os rios, formando grandes reservatórios de trechos lóticos (Godinho *et al.*, 2007; Nestler *et al.*, 2012; Nogueira & Sá, 2015; Orsi, *et al.*, 2016). Por serem espécies migradoras, o isolamento populacional pelas barragens afeta diretamente na manutenção das populações a partir da reprodução (Bignotto *et al.*, 2009). No ano de 2022, após análise de especialistas que comprovaram o declínio populacional (taxa de pelo menos 30% em relação a dados de três tempos geracionais – 45 anos), o *P. corruscans* foi incluído no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, justamente pela ameaça das instalações de hidroelétricas no curso dos rios (Ficha de Avaliação do Risco de Extinção do Pintado – ICMBio, 2019).

Os impactos significativos das barragens sobre o gênero *Pseudoplatystoma* potencializam seus danos sobre as populações quando associadas a outros problemas que afetam diretamente as populações naturais, como a presença de híbridos que, na maioria dos casos, competem pelo mesmo nicho ecológico, gerando desequilíbrios no ambiente, que podem levar a extinção de espécies (Sales *et al.*, 2018). A ameaça dos híbridos sobre as populações naturais é potencializada em casos de fertilidade por parte desses indivíduos, já que possibilita o retrocruzamento com suas espécies parentais e resulta na introgressão genética, possível perda de *fitness* adaptativo e redução da integridade genética das espécies puras (Allendorf *et al.*, 2001; Olden *et al.*, 2004; Porto-Foresti *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2012b; Prado *et al.*, 2017).

A presença de híbridos na natureza está cada vez mais comum, em decorrência da degradação de ambientes, introdução de espécies, escapes e introduções indevidas da piscicultura, e mudanças nas distribuições das espécies em razão das mudanças climáticas

(Rhymer & Symbeloff, 1996; Allendorf *et al.*, 2001; Scribner *et al.*, 2001). Em 2012, Prado *et al.* identificaram híbridos F1 e pós-F1 em rios da bacia do Alto Paraná, rio Paraná e Mogi-guaçu, e da sub-bacia do Paraguai, rio Aquidauana. Entre as 186 amostras analisadas, previamente identificadas como puros por métodos diagnósticos morfológicos, 10 eram híbridos da linhagem F1 e um exemplar tratava-se de um híbrido avançado, coletado no rio Mogi-guaçu. Os espécimes eram, em sua maioria, “cachapintas” (*P. reticulatum* ♀ X *P. corruscans* ♂), destaque na produção piscícola pela maior facilidade de reprodução, maior período reprodutivo (Resende *et al.*, 1996; Godinho, 2007) e melhor resposta a indução hormonal, e por deterem melhor desempenho que a “pintachara” em taxas de crescimento e desenvolvimento (*P. corruscans* ♀ X *P. reticulatum* ♂) (Porto-Foresti *et al.*, 2008, 2010; Campos, 2010, Prado *et al.*, 2011b).

A identificação desses indivíduos provenientes de coletas no ambiente foi associada a escapes e introdução de peixes de estoques de cultivo, onde a manipulação genética, frequentemente, não é acompanhada de eficientes programas de monitoramento e fiscalização (Orsi & Agostinho, 1999; Fernandes *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2011, 2014; Prado *et al.*, 2012). Outros autores, também já relataram a introdução de híbridos relacionada as atividades de pescaria esportiva e piscicultura em várias partes do Brasil (Hashimoto *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2012, 2017; Vaini *et al.*, 2014; Yabu *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019).

A mitigação dos efeitos da hibridação no meio ambiente conta com o auxílio de projetos voltados à proteção do pintado, categorizado como vulnerável em 2022 pelo ICMBio. Em destaque, temos o Plano de Recuperação do Pintado, que define os critérios para a pesca desse peixe, e o Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies de Peixes Ameaçadas de Extinção da Bacia do Alto Rio Paraná – PAN Alto Paraná, que tem como objetivo prevenir e

mitigar impactos das espécies em situação de risco na região de estudo a partir da colaboração de pesquisadores que atuam em suas áreas específicas.

A ameaça dos híbridos para os estoques naturais ainda não foi contida, mesmo com estudos que comprovam sua presença no ambiente e alertam sobre os riscos ecológicos e genéticos, principalmente para as espécies parentais. Contornar a situação já avançada das linhagens híbridas é um trabalho complexo, uma vez que não há amparo legislativo específico para a produção e manejo desses indivíduos, que auxiliem na contenção de escapes (Hashimoto *et al.*, 2014; Nobile *et al.*, 2020), e por estarmos lidando com anos de práticas de manejo indevidas, que intensificam os riscos sob as espécies, com ênfase para o *P. corruscans*, presente listado em lista de animais em risco de extinção, e favorecem as populações híbridas.

1.4 Ferramentas para o monitoramento genético aplicado à conservação

Os peixes híbridos são formados pelo cruzamento entre espécies ou linhagens distintas que originam indivíduos de características intermediárias (Mayr, 1963). A diferenciação entre as espécies puras e os híbridos, portanto, não é eficaz quando apenas baseada em evidências morfológicas, principalmente, quando trata-se da identificação em fase larval e juvenil, ou em casos de híbridos avançados, que se assemelham muito a uma das espécies parentais (Porto-Foresti *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011). Em decorrência da imprecisão dos métodos diagnósticos morfológicos, a diferenciação efetiva das espécies deve ser baseada no conteúdo genético dos exemplares sob análise, uma vez que o genoma está repleto de polimorfismos, tanto na região nuclear quanto na mitocondrial, capazes de distinguir perfis genéticos a partir dos marcadores moleculares espécie-específicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os táxons podem ser distinguidos utilizando marcadores moleculares diagnósticos monomórficos entre as espécies, que são caracterizados por possuírem pouca variação (genes nucleares conservados e SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*), ou marcadores multialélicos polimórficos (microssatélite ou SSR – *Simple Sequence Repeat*), que além de identificar espécies podem acessar a diversidade genética e detectar a frequência e tamanhos alélicos (Schwartz *et al.*, 2007).

Para a identificação de híbridos, as regiões relativamente conservadas do genoma nuclear (nDNA), como os genes que acumulam diferenças em nível de espécie sem variação intraespecífica, são úteis devido a seu caráter de marcador biparental (são geneticamente heterozigotos) (Hashimoto *et al.*, 2011a; Porto-Foresti *et al.*, 2011) e providenciam uma melhor compreensão das misturas genéticas e introgressão, permitindo explorar melhor a hibridação e seus impactos na diversidade genética (Díaz-Arce *et al.*, 2024; Arnold, 1997). Já o DNA mitocondrial, por ser uma herança exclusivamente materna em peixe, com altas taxas evolutivas e facilidade de isolamento (Moritz *et al.*, 1987), possibilita a determinação da espécie parental materna envolvida no cruzamento, híbridos recíprocos e no entendimento da direção de eventos de hibridação em estoques selvagens (Awise, 1986; Broughton *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2024).

Técnicas embasadas em polimorfismo espécie-específico, como o PCR-Multiplex (*Polymerase Chain Reaction*) e o PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), são eficazes, de baixo custo e fornecem resultados rápidos (Porto-Foresti *et al.*, 2013), sendo a melhor opção para estudo de reconhecimento de espécies.

Em relação aos híbridos avançados, os pós-F1, a distinção entre os indivíduos híbridos e membros das populações parentais submetidos a introgressão, é complexa (Rhymer & Simberloff, 1996), por conta do alto número de combinações genéticas resultantes de

intercruzamentos de híbridos entre si ou retrocruzamento com suas espécies parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1994, 1998; Scribner, 2001).

As análises moleculares devem ser orientadas pelo histórico das espécies trabalhadas, no caso do híbrido *P. corruscans* X *P. reticulatum*, temos um cruzamento popular na piscicultura e que já teve seu híbrido relatado em ambientes naturais (Hashimoto *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012; Prado *et al.*, 2012, 2017; Vaini *et al.*, 2014; Yabu *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019), logo temos que considerar taxas mais altas de introgressão. Em virtude disso, a utilização de apenas um alelo diagnóstico (um marcador molecular) para híbridos pós-F1 poderá gerar como resultado uma homozigose como seu parentais ou heterozigose como um híbrido F1 (Toledo-Filho *et al.*, 1994; Allendorf *et al.*, 2001). Para evitar esses tipos de resultados errôneos para híbridos avançados, recomenda-se a utilização de um conjunto de marcadores nucleares, para que seja capaz de ocorrer a identificação de hibridação introgressiva (Sanz *et al.*, 2009; Allendorf *et al.*, 2010).

Os marcadores microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são repetições em *tadem* de dois a seis pares de base, distribuídas por todo o genoma nuclear, altamente polimórficas (Ferreira & Grattapaglia, 1998) e que podem fornecer marcadores adicionais na diferenciação entre espécies parentais e híbridos, tendo em vista que os alelos parentais são transmitidos à prole pela herança mendeliana clássica (Kang *et al.*, 2011). Além disso, esses marcadores são os mais utilizados em análises de genética de populações (Diyie *et al.*, 2021) permitindo o acesso a diversidade genética e detecção de estruturação, graças ao seu perfil de codominância e polimorfismo (Ciofi *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2024).

2 OBJETIVOS

Tendo em vista o estado atual de conservação do bagre *Pseudoplatystoma corruscans*, o pintado, e as implicações dos híbridos sobre as populações naturais, o presente trabalho têm como principal objetivo colaborar com a ação 5 do Projeto Pro-Pardo, o Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies de Peixes Ameaçadas de Extinção (PAN), o qual busca conhecer, prevenir e mitigar impactos sobre as espécies sob risco de extinção e preservar seus habitats localizados nos rios pertencentes ao Alto do rio Paraná. Em suma, esse trabalho visa:

- 1) realizar um monitoramento genético, por meio dos marcadores moleculares, do ambiente natural, e verificar a possível ocorrência de híbridos na natureza e ainda se estes animais estão se reproduzindo e retrocruzando com seus parentais;
- 2) analisar a frequência de ocorrência de peixes híbridos das espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum*, localizados nos rios pertencentes a bacia do Alto do rio Paraná, que estejam na abrangência do PAN – Alto Paraná;
- 3) promover a ordenação de dados biológicos das linhagens parentais e híbridas que representem informações importantes, com relação à situação atual das populações naturais de *P. corruscans* e *P. reticulatum* no que diz respeito à sua integridade genética, para fins de conservação destas espécies;
- 4) com base em dados genéticos, obter subsídios para propor aos órgãos competentes que seja realizado uma fiscalização da produção destes híbridos em pisciculturas, o que permitirá um controle adequado sobre o uso destes animais de forma a minimizar os impactos negativos para o meio ambiente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem do material biológico

O material analisado foi coletado e concedido para a pesquisa pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental - CEPTA/ICMBio, instituição responsável pela coordenação do PAN Alto Paraná, plano o qual o presente trabalho é contribuinte.

Foram analisadas amostras de nadadeira de indivíduos adultos pertencentes a três rios da região do Alto Paraná: o Grande, o Pardo e o Mogi-guaçu (Figura 3). As coletas do rio Grande foram realizadas na cidade de Colômbia-SP (20° 10' 33" S, 48° 41' 20" O), já as do rio Pardo e Mogi-guaçu não tiveram o local exato da coleta repassados. No total, 78 indivíduos foram coletados, sendo 53 exemplares do rio Grande, coletados em junho de 2018, 14 do rio Pardo e 11 do rio Mogi-guaçu, ambos coletados entre os anos de 2023 e 2024.

Os indivíduos amostrados nos rios Pardo e Mogi-guaçu, vieram acompanhadas de uma identificação inicial, baseada na morfologia, e realizada pelos responsáveis da coleta. Posteriormente, os resultados com base morfológica e molecular foram comparados para demonstrar a importância dos marcadores moleculares diagnósticos no levantamento de híbridos (Tabela 1).

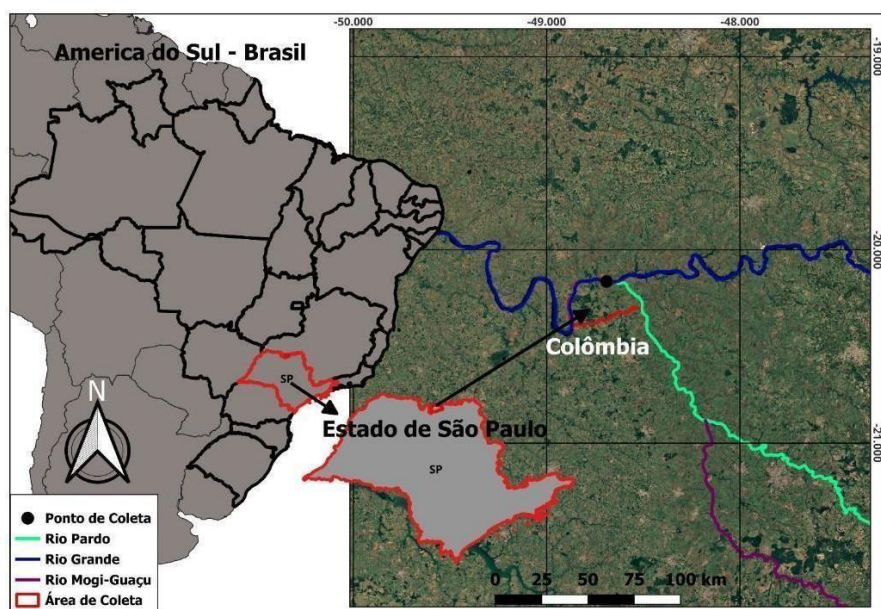


Figura 3: Localização dos rios analisados. Em azul temos o rio Grande, em verde o rio Pardo e em roxo o rio Mogi-guaçu. Destacado em vermelho temos a cidade de Colômbia, local de coleta do rio Grande.

Tabela 1: comparação entre os resultados com base morfológica (identificação inicial) e molecular

Número da amostra	Local de coleta	Identificação morfológica	Identificação molecular
18042	Rio Pardo	<i>P. reticulatum</i>	Híbrido pós-F1
18043	Rio Pardo	<i>P. reticulatum</i>	Híbrido pós-F1
18044	Rio Pardo	<i>P. reticulatum</i>	Híbrido pós-F1
18045	Rio Pardo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18046	Rio Pardo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18047	Rio Pardo	<i>P. reticulatum</i>	<i>P. reticulatum</i>
18048	Rio Pardo	<i>P. reticulatum</i>	<i>P. reticulatum</i>
18049	Rio Pardo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18050	Rio Pardo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18051	Rio Pardo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1

Número da amostra	Local de coleta	Identificação morfológica	Identificação molecular
18052	Rio Pardo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18053	Rio Pardo	<i>P. reticulatum</i>	<i>P. reticulatum</i>
18054	Rio Pardo	<i>P. reticulatum</i>	<i>P. reticulatum</i>
18055	Rio Pardo	<i>P. corruscans</i>	<i>P. corruscans</i>
18056	Rio Mogi	<i>P. reticulatum</i>	<i>P. reticulatum</i>
18057	Rio Mogi	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18058	Rio Mogi	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18059	Rio Mogi	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18060	Rio Mogi	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18061	Rio Mogi	<i>P. reticulatum</i>	Híbrido pós-F1
18062	Rio Mogi	<i>P. corruscans</i>	Híbrido pós-F1
18063	Rio Mogi	<i>P. corruscans</i>	<i>P. reticulatum</i>
18064	Rio Mogi	<i>P. corruscans</i>	<i>P. reticulatum</i>
18065	Rio Mogi	<i>P. reticulatum</i>	<i>P. corruscans</i>
18066	Rio Mogi	<i>P. reticulatum</i>	Híbrido pós-F1

As nadadeiras, após coletadas, foram fixadas em álcool absoluto e encaminhadas ao Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE), localizado na Unesp campus Bauru.

3.2 Extração de DNA

Os fragmentos de tecido foram submetidos ao processo de extração de DNA, utilizando o Kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega*”, de acordo com o seguinte protocolo:

1. Numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5ml);
2. Retirar um fragmento de tecido, secar em papel toalha para retirar o álcool, colocar no tubo de microcentrífuga e levar para estufa, a 37°C, por aproximadamente 10 min;
3. Adicionar 300 µL de *Nuclei Lysis Solution* ao tecido;
4. Adicionar 4 µL de *Proteinase K* e passar pelo vórtex;
5. Realizar a picotagem do tecido, a fim de facilitar a digestão;
6. Incubar em banho-maria, a 60°C, por 2 horas (vortexar sempre que possível);
7. Retirar do banho-maria e deixar voltar à temperatura ambiente;
8. Adicionar 2,5 µL de *RNAse*, misturar por inversão (5x) e levar para estufa (ou em banho-maria), a 37°C, por 30 min;
9. Retirar da estufa e deixar voltar à temperatura ambiente, por 5 min;
10. Adicionar 200 µL de *Protein Precipitation* solution e vortexar por 20s;
11. Levar ao gelo por 5 min;
12. Centrifugar por 4 min a 14.000 rpm;
13. Transferir o sobrenadante para a segunda série de microtubos e adicionar 600 µL de Isopropanol gelado e misturar por inversão (5x);
14. Centrifugar por 4 min a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante.
15. Adicionar 600 µl de etanol 70% à temperatura ambiente e centrifugar por 4 min a 13.000 rpm.
16. Descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente overnight ou em estufa por cerca de 1h.

17. Adicionar 35 µl de *DNA rehydration solution* por 12h em temperatura ambiente ou por 1h à 60°C.

O DNA genômico extraído foi quantificado em gel de agarose 1% através da comparação com o padrão do marcado *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

3.3 Amplificação dos marcadores diagnósticos

Seguido da extração de DNA, executou-se a aplicação de 5 marcadores diagnósticos pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) no formato multiplex. Foram aplicados 4 genes nucleares, sendo eles, *RAG2* (*Recombination activating gene 2*), *GLOBINA* (β globina), *EF1- α* (*Nuclear elongation factor*), o *Prt36* (marcador do tipo microsatélite), e um gene mitocondrial, o 16S.

Esse conjunto de marcadores (Tabela 2) foi utilizado por possibilitar a identificação da linhagem materna dos híbridos, por meio do marcador mitocondrial, assim como seu estágio de hibridação, linhagem recente ou avançada, pela comparação dos resultados fornecidos pelos marcadores da região nuclear.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose, com concentração 2%. Misturado as amostras, aplicou-se um *mix* de *Gel Red Nucleic Acid* (Biotium) (0,5 uL por amostra), que garante a fluorescência, e *Blue Juice Loading Buffer* (Invitrogen) (1,25 uL por amostra), que fornece o peso molecular adequado para a corrida. A análise dos resultados, no formato de bandas, ocorreu pela comparação do tamanho dos fragmentos amplificados com os marcadores de peso molecular e concentração, *MassRuler Low Range DNA Ladder* e *Star 1kb DNA* (Cellco), visualizados por intermédio do transiluminador (*Loccus biotecnologia*) e capturados pela câmera OLYMPUS, C-5060.

Tabela 2: Sequência de *primers* dos genes nucleares, mitocondrial e microsatélites utilizados para a identificação dos espécimes.

Primer	Sequência*	Referências
<i>16S F</i>	ACGCCGTTTATCAAAAACAT	Palumbi, 1996
<i>16S R</i>	CCGGTCTGAACTCAGATCCGT	Palumbi, 1996
<i>16S PcF</i>	TGACGATCCTATCCGGCTAT	Prado <i>et al.</i> , 2011a
<i>16S PrR</i>	TACCTGTTATTGGGTTGTA	Prado <i>et al.</i> , 2011a
<i>RAG2 Silu F</i>	CCTGAGTGCTACCTATTCATGGA	Prado <i>et al.</i> , 2011a
<i>RAG2 Silu R</i>	CTTGGGAGGAGAGACCATC	Prado <i>et al.</i> , 2011a
<i>RAG2 PcR</i>	AACTCCACCACTCTGAATAAATG	Prado <i>et al.</i> , 2011a
<i>RAG2 PrIR</i>	CAGTTCCAGGTCTCTGTGGTT	Prado <i>et al.</i> , 2011a
<i>EF1α 835 F</i>	ATTGGAACCTACCTGTGG	Moyer <i>et al.</i> , 2004
<i>EF1α1417R</i>	CAGCCTTCTGTGCAGACTT	Moyer <i>et al.</i> , 2004
<i>EF1α PcR</i>	CAACAATGCACGCATCTCT	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a
<i>EF1α PrF</i>	ATAAAGACCCAGACAAGATCG	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a
<i>Glob Silu F</i>	TCAATATGGTTCATGGACAGA	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a
<i>Glob Silu R</i>	CCAGAAGCTGAAAGTAGACAGT	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a
<i>Glob PcR</i>	CAGCCACTTGGGGTTTCCT	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a
<i>Glob PrF</i>	GGTACGTCTATCTCAGTAATTGAAA	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a
<i>Prt36 F</i>	ACCGAGCACAGCACAGAAC	Prado <i>et al.</i> , 2014
<i>Prt36 R</i>	AAGGCAATGGTTGGAAGAA	Prado <i>et al.</i> , 2014

*Sequência na ordem 5' – 3', Silu: Siluriformes, F: *forward*, R: *reverse*, em negrito estão os primers espécie-específicos

3.3.1 Genes nucleares

A amplificação dos genes nucleares *RAG2*, *GLOBINA* e *EF1α*, foi feita a partir da técnica de PCR-Multiplex, com *primers* universais para a ordem dos Siluriformes e os *primers* espécie-específico. A PCR teve como volume final 25uL, com exceção do gene *EF1α*, de volume final igual a 13,1uL. As seguintes reações foram utilizadas, junto a seus respectivos programas no termociclador *Applied Biosystems* (Tabela 3).

Tabela 3: Reações e protocolos do termociclador utilizados para cada gene nuclear.

Gene	Reação		Programa termociclador	
	Reagentes	Concentração final	Temperatura	Tempo
RAG2	16,1 uL de H2O PCR ultra pura			
	3,0 uL de dNTP mix	100mM		
	2,0 uL de <i>PCR buffer</i>	1X		
	0,75 uL de MgCl ₂	50mM	95°C	5 min
	0,6 uL de RAG2 Silu R	10uM	95°C	30 s
	0,6 uL de RAG2 Silu F	10uM	58°C	30 s
	0,6 uL de RAG2 PcR	10uM	72°C	10 s
	0,35 uL de RAG2 PrR II	10uM	72°C	10 min
	0,1 uL de Taq Polymerase	5U/uL		
	1,0 uL de DNA	10-30ng/uL		
	25 uL			
Globina	17,35 uL de H2O PCR ultra pura			
	1,5 uL de dNTP mix	100mM		
	2,5 uL de <i>PCR buffer</i>	1X	95°C	5 min
	0,75 uL de MgCl ₂	50mM	95°C	30 s
	0,5 uL de Glob Silu R	10uM	59°C	30 s
	0,5 uL de Glob Silu F	10uM	72°C	20 s
	0,5 uL de Glob PcR	10uM	72°C	10 min
	0,3 uL de Glob PrF	10uM		
	0,1 uL de Taq Polymerase	5U/uL		
	1,0 uL de DNA	10-30ng/uL		
	25 uL			
EF1α	8,75 uL de H2O ultra pura			
	0,25 uL de dNTP mix	100mM		
	1,25 uL de <i>PCR buffer</i>	1X	95°C	5 min
	0,75 uL de MgCl ₂	50mM	95°C	30 s
	0,25 uL de EF1α 835 F	10uM	59°C	30 s
	0,25 uL de EF1α 1417 R	10uM	72°C	20 s
	0,25 uL de EF1α PcR	10uM	72°C	7 min
	0,25 uL de EF1α PrF	10uM		
	0,1 uL de Taq Polymerase	5U/uL		
	1,0 uL de DNA	10-30ng/uL		
	13,1 uL			

3.3.2 Gene mitocondrial

Apenas um gene mitocondrial foi amplificado, a fim de diferenciar as linhagens híbridas “pintachara” e “cachapinta” e identificar retrocruzamentos, a partir da identificação da herança mitocondrial materna. A PCR foi feita seguindo os seguintes critérios (Tabela 4):

Tabela 4: Reação e protocolo do termociclador utilizados para o gene mitocondrial 16S.

Gene	Reação		Programa termociclador	
	Reagentes	Concentração final	Temperatura	Tempo
16S	15,45 uL de H2O ultra pura			
	3,0 uL de dNTP mix	100mM		
	2,0 uL de PCR buffer	1X		
	0,75 uL de MgCl ₂	50mM	95°C	5 min
	0,7 uL de 16S R	10uM	95°C	30 s
	0,5 uL de 16S R	10uM	57°C	30 s
	0,25 uL de 16S PcF	10uM	72°C	10 s
	1,25 uL de 16S PrR	10uM	72°C	10 min
	0,1 uL de Taq Polymerase	5U/uL		
	1,0 uL de DNA	10-30ng/uL		
	25 uL			

3.3.3 Microsatélites

Os marcadores microsatélite (SSR) são usualmente utilizados em análises de genética de populações (Diye *et al.*, 2021) por permitir acessar a diversidade genética e detecção de estruturação (Ciofi *et al.*, 2011; Vu *et al.*, 2024). Ademais, devido ao alto polimorfismo, diferenças em relação ao número de repetições em *tandem* entre as espécies permite a aplicação dos SSR como marcadores moleculares diagnósticos. Prado *et al.*, 2014, desenvolveu e caracterizou 16 microsatélites para o bagre neotropical *Pseudoplatystoma reticulatum*, com transferabilidade para a espécie *Pseudoplatystoma corruscans*. Seis dos 16 *loci* não apresentaram sobreposição alélica entre o tamanho dos fragmentos característicos de cada uma das espécies, podendo ser aplicado em estudo diagnósticos de híbridos.

O *Prt36*, aplicado no estudo, foi o microsatélite que apresentou maior distância entre os fragmentos característicos de cada espécie, sendo ideal para visualização do resultado em gel de agarose 2%. As condições da PCR foram as seguintes (Tabela 5).

Tabela 5: Reação e protocolo do termociclador utilizados para a amplificação do microssatélite Prt36.

Microssatélite	Reação		Programa termociclador	
	Reagentes	Concentração final	Temperatura	Tempo
Prt36	10,35 uL de H2O ultra pura			
	0,75 uL de dNTP mix	100mM		
	1,5 uL de PCR buffer	1X	95°C	10 min
	0,9 uL de MgCl2	50mM	94°C	45 s
	0,6 uL de Prt36 F	10uM	58°C	50 s
	0,6 uL de Prt36 R	10uM	72°C	50 s
	0,1 uL de Taq Polymerase	5U/uL	72°C	10 min
	1,0 uL de DNA	10-30ng/uL		
15 uL				

3.4 Avaliação de híbridos e introgressão por marcadores moleculares

Os exemplares coletados no ambiente foram identificados através dos padrões de banda diagnósticos de cada marcador (Tabela 6). As espécies puras apresentam os marcadores monomórficos espécie-específicos para todos os genes analisados. Os híbridos F1 são caracterizados pela heterozigose para todos os marcadores nucleares. Já nos híbridos pós-F1 observa-se resultados variáveis entre os marcadores nucleares e até mesmo em comparação com o mitocondrial, utilizado no estudo para a identificação da fêmea dos cruzamentos. Os híbridos avançados podem pertencer a linhagens híbridas F2, F3, etc ou retrocruzamentos.

Tabela 6: Tamanho em pares de base dos fragmentos diagnósticos característicos para as espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Técnica	Gene	Fragmento diagnóstico (pb)		Referência
		Pr	Pc	
PCR-Multiplex	DNAn	<i>RAG 2</i>	550,290 / 550,330	Prado <i>et al.</i> , 2011
		<i>Globina</i>	569,137 / 569,304	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a

Técnica	Gene	Fragmento diagnóstico (pb)		Referência
		Pr	Pc	
	<i>EF1α</i>	800,630	800,520	Hashimoto <i>et al.</i> , 2013a
	DNAmt <i>16S</i>	650,400	650,200	Prado <i>et al.</i> , 2011
PCR-Singleplex	DNAn <i>Prt36</i>	232-252	329-405	Prado <i>et al.</i> , 2014

DNA: DNA nuclear, DNAmt: DNA mitocondrial, Pr: *P. reticulatum*, Pc: *P. corruscans*, pb: pares de bases

4 RESULTADOS

Após a análise comparativa dos resultados de cada marcador, foi detectado a frequência de aproximadamente 77% (60) de híbridos avançados na amostragem total, enquanto os puros representaram 14% (11) para a espécie *P. corruscans* e 9% (7) para *P. reticulatum*. Avaliando os rios individualmente obtivemos: rio Grande: ≈83% (44) de híbridos pós-F1 e ≈17% (9) de *P. corruscans*; rio Pardo: ≈64% (9) de híbridos pós-f1, ≈7% (1) de *P. corruscans* e ≈28% (4) de *P. reticulatum* e rio Mogi-guaçu: ≈64% (7) de híbridos pós-F1, ≈27% (3) de *P. reticulatum* e ≈9% (1) de *P. corruscans*.

Para todos os locais amostrados temos o domínio de híbridos avançados sobre as espécies parentais puras, no caso do rio Mogi todas as amostras eram pertencentes a híbridos pós-F1. Na tabela 7 podemos observar os resultados de todas as amostras para cada um dos marcadores.

Tabela 7: Resultado observado a partir da aplicação dos marcadores diagnósticos.

Rio	Número da amostra	Fenótipo	16S RAG2 GLOBINA EF1α Prt36										Classificação
			Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	
Pardo	18042	Pr	X	-	X	-	X	X	X	-	X	-	Hp
	18043	Pr	-	X	X	-	-	X	X	-	X	X	Hp
	18044	Pr	-	X	X	-	-	X	X	-	X	X	Hp

Rio	Número da amostra	Fenótipo	16S		RAG2		GLOBINA		EF1 α		Prt36		Classificação
			Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	
	18045	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18046	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18047	Pr	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	Pr
	18048	Pr	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	Pr
	18049	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18050	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18051	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18052	Pc	X	-	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18053	Pr	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	Pr
	18054	Pr	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	Pr
	18055	Pc	-	X	-	X	-	X		X	-	X	Pc
Mogi-guaçu	18056	Pr	X	-	X		X	-	X	-	X	-	Pr
	18057	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	-	Hp
	18058	Pc	-	X	X	X		X	X	X	X	X	Hp
	18059	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	-	X	Hp
	18060	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18061	Pr	-	X	X	X	-	X	-	X	X	-	Hp
	18062	Pc	-	X	X	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	18063	Pc	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	Pr
	18064	Pc	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	Pr
	18065	Pr	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	18066	Pr	-	X	X	X	-	X	-	X	-	X	Hp
Rio Grande	11414	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Hp
	11415	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11416	-	-	X	-	X	-	X	X	X	-	X	Hp
	11417	-	-	X	X	X	-	X	-	X	-	X	Hp
	11418	-	-	X	-	X	X	X	-	X	-	X	Hp
	11419	-	-	X	-	X	X	X	-	X	X	X	Hp
	11422	-	-	X	-	X	-	X	X	X	-	X	Hp
	11423	-	-	X	X	-	X	X	-	X	-	X	Hp
	11474	-	-	X	-	X	-	X	X	X	X	X	Hp
	11475	-	-	X		X	-	X	X	X	X	-	Hp
	11476	-	-	X		X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11477	-	-	X		X	X	X	X	X	-	X	Hp

Rio	Número da amostra	Fenótipo	16S RAG2 GLOBINA EF1α Prt36										Classificação
			Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	
	11478	-	-	X	X	-	-	X	X	-	X	X	Hp
	11479	-	-	X	-	X	X	X	-	X	X	X	Hp
	11480	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11481	-	-	X	X	-	X	X	X	X	X	X	Hp
	11482	-	-	X	X	-	X	X	-	X	-	X	Hp
	11483	-	-	X	-	X	X	X	X	X	X	-	Hp
	11484	-	-	X	-	X	X	X	-	X	X	X	Hp
	11485	-	-	X	-	X	-	X	-	X	X	-	Hp
	11486	-	-	X	-	X	X	X	X	X	-	X	Hp
	11487	-	-	X	-	X	X	X	-	X	X	X	Hp
	11488	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11489	-	-	X	-	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	11490	-	-	X	-	X	X	X	-	X	X	X	Hp
	11491	-	-	X	-	X	X	X	-	X	-	X	Hp
	11492	-	-	X	X	-	X	X	-	X	X	X	Hp
	11493	-	-	X	-	X	X	X	-	X	-	X	Hp
	11495	-	-	X	-	X	X	X	X	-	-	X	Hp
	11496	-	-	X	-	X	X	X	X	-	X	X	Hp
	11497	-	-	X	X	-	X	X	X	X	-	X	Hp
	11498	-	-	X	-	X	X	X	-	X	-	X	Hp
	11499	-	-	X	X	-	X	X	-	X	-	X	Hp
	11500	-	-	X	-	X	X	X	X		X	-	Hp
	11501	-	-	X	-	X	X	X	-	X	-	X	Hp
	11502	-	X	-	-	X	-	X	-	X	-	X	Hp
	11503	-	-	X	-	X	X	X	X		X	-	Hp
	11504	-	-	X	X	-	X	X	X	X	-	X	Hp
	11505	-	-	X	-	X	X	X	-	X	-	X	Hp
	11506	-	-	X	-	X	-	X	X	X	-	X	Hp
	11507	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11508	-	-	X	-	X	-	X	-	X	X	X	Hp
	11509	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11510	-	X	-	-	X	-	X	-	X	-	X	Hp
	11511	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11512	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc
	11513	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	Pc

Rio	Número da amostra	Fenótipo	16S		RAG2		GLOBINA		EF1 α		Prt36		Classificação
			Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	
	11514	-	X	-	-	X	-	X	-	X	-	X	Hp
	11515	-	-	X	-	X	-	X	X	X	-	X	Hp
	11516	-	-	X	X	-	X	X	X	X	-	X	Hp
	11517	-	X	-	-	X	X	X	X	-	X	-	Hp
	11518	-	X	-	-	X	X	X	-	X	X	X	Hp
	11519	-		X	-	X	-	X	X	X	X	X	Hp

Pc: *P. corruscans*, Pr: *P. reticulatum*, HP: híbridos pós-F1, X: alelo presente.

Já na tabela 8 baixo temos o número exato de exemplares para cada uma das linhagens, enquanto na figura 4 vemos a proporção das linhagens sobre o total analisado em cada rio.

Tabela 8: Resultado da identificação das amostras dos rios Grande, Pardo e Mogi-guaçu após aplicação dos marcadores moleculares e mitocondrial.

Localidade	Época de coleta	N				Total
		Pc	Pr	H1	HP	
rio Grande	2018	9	0	0	44	53
rio Pardo	2023-2024	1	4	0	9	14
rio Mogi-Guaçu	2023-2024	1	3	0	7	11
Total		11	7	0	60	78

N: número amostral, Pc: *P. corruscans*, Pr: *P. reticulatum*, H1: híbridos F1, HP: híbridos pós-F1

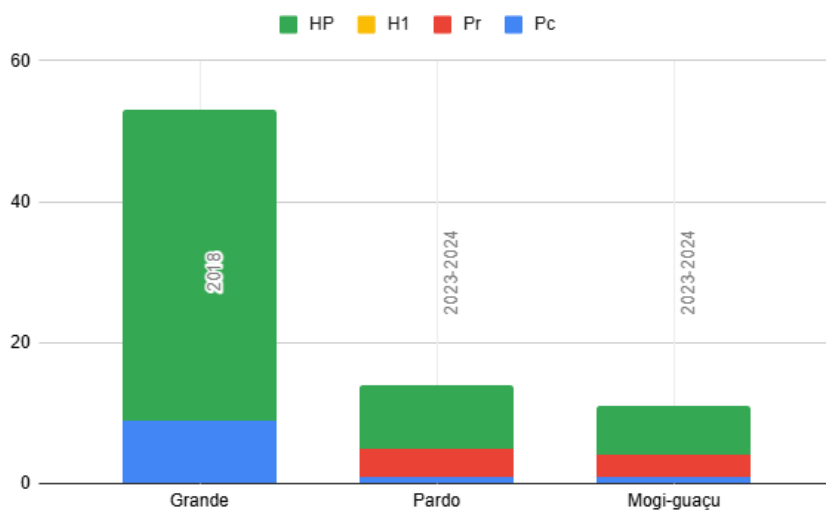


Figura 4: Proporção de indivíduos por linhagem em cada um dos rios analisados. HP: híbrido pós-F1; H1: híbridos F1; Pr: *Pseudoplatystoma reticulatum*; Pc: *Pseudoplatystoma corruscans*.

A identificação dos indivíduos, foi realizada a partir da comparação entre os resultados de cada um dos marcadores moleculares diagnóstico, visualizados em gel de agarose (Figura 5).

Abaixo podemos observar três amostras identificadas como *P. corruscans*, *P. reticulatum* e um híbrido avançado (pós-F1), percebe-se que para as espécies puras há homozigose para todos os marcadores, enquanto o híbrido temos a variação dos resultados, apresentando tanto homozigotes quanto heterozigotes.

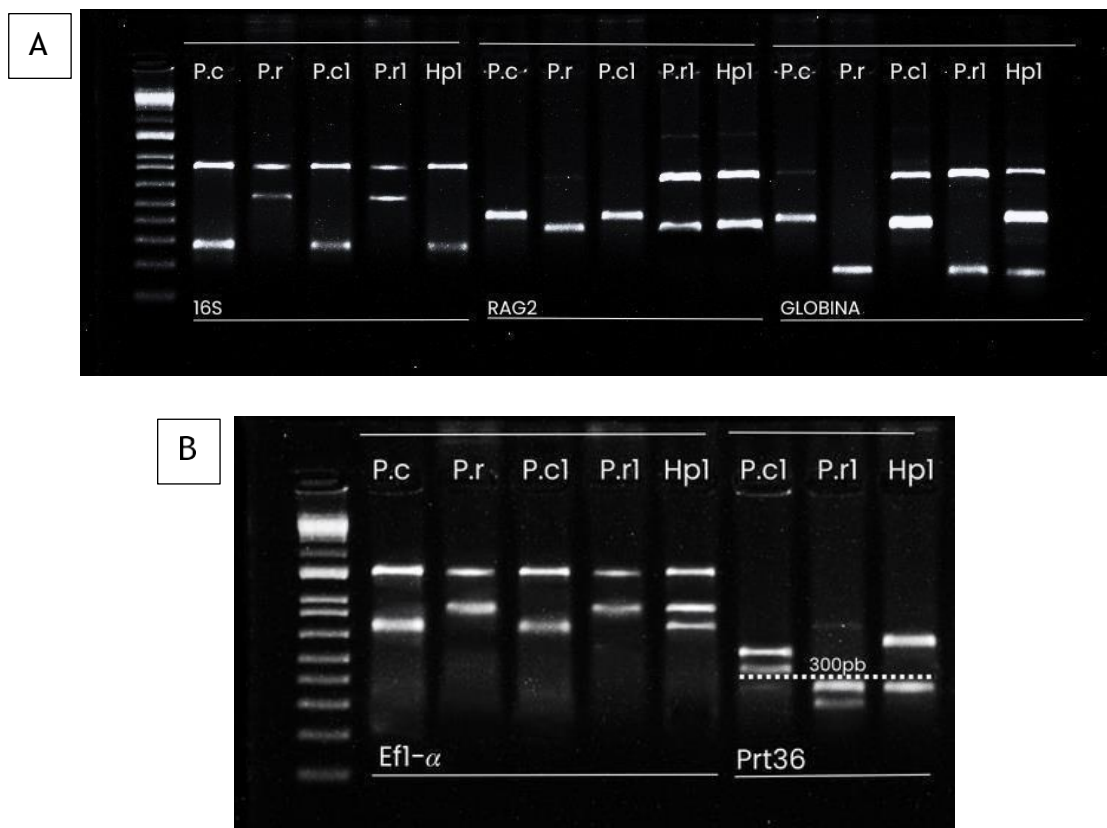


Figura 5: Identificação de 3 indivíduos por meio da comparação dos resultados dos marcadores nucleares e mitocondrial. A: marcadores 16S, RAG2 e GLOBINA; B: marcadores *Efl-alfa* e *Prt36*; Pc: *Pseudoplatystoma corruscans* controle; Pr: *Pseudoplatystoma reticulatum* controle; P.c1: amostra identificada como pintado; P.r1: amostra identificada como cachara; Hp1: amostra identificada como híbrido pós-F1.

Vale ressaltar que as amostras coletadas nos rios Pardo e Mogi-guaçu tiveram uma identificação inicial, feita pelos colaboradores, baseada na morfologia. Dos 25 exemplares apenas 8 determinações estavam corretas, um espécime da espécie *P. corruscans* e 7 de *P. reticulatum*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Levantamento bibliográfico de detecções de híbridos no Alto rio Paraná

Estudos com enfoque no levantamento e identificação de indivíduos híbridos na região do Alto rio Paraná já foram publicados por outros autores, como Prado *et al.*, 2012, 2017 e Vaini *et al.*, 2014. Os exemplares utilizados nesses estudos foram coletados entre os anos de 1998 e 2011, nos rios Paraná, Mogi-guaçu, Verde, Paranapanema, Dourados, Ivinhema Iguaçu e Brilhante, todos integrantes da bacia do Alto rio Paraná. Os resultados adquiridos (Tabela 9) servem de base para compreender o avanço e perpetuação dos híbridos em ambientes naturais, e os efeitos disso para as populações selvagens de *P. corruscans*, atualmente em estágio vulnerável de ameaça.

Tabela 9: Resultados obtidos nos trabalhos utilizados como bibliografias para o levantamento da detecção de híbridos na região do Alto rio Paraná.

Bibliografia	Rio	Período de coleta	n	<i>P. corruscans</i>	<i>P. reticulatum</i>	H. F1	H. pós-F1
Prado <i>et al.</i> , 2012	Paraná	2003-2008	51	49	0	2	0
	Verde		14	14	0	0	0
	Mogi-guaçu		10	5	0	4	1
Prado <i>et al.</i> , 2017	Paraná	1998 - 2011	49	35	14	0	0
	_Verde		43	43	0	0	0

Bibliografia	Rio	Período de coleta	n	<i>P. corruscans</i>	<i>P. reticulatum</i>	H. F1	H. pós-F1
	Mogi-guaçu	2007- 2012	43	11	14	10	8
	Ivinhema		19	19	0	0	0
	Paranapanema		34	30	4	0	0
	Iguaçu		19	5	14	0	0
Vaini <i>et al.</i> , 2014	Dourados	2007- 2012	90	45	1	34	10
	Ivinhema		49	18	1	22	8
	Brilhante		11	3	0	5	3
Total			432	277	48	77	30

n: número amostral; H.F1: híbridos da linhagem F1; H. pós-F1: híbridos pós F1

Ao comparar os resultados obtidos nesse trabalho com os trabalhos anteriores, as principais divergências entre eles são o aumento da ocorrência de híbridos na natureza, em especial a de híbridos avançados, e a procedência dos híbridos, isto é, por qual via esses híbridos foram introduzidos.

Nos exemplares analisados por Prado *et al.*, 2012, 2017 e Vaini *et al.*, 2014, híbridos foram identificados, majoritariamente como pertencentes a geração F1 e linhagem “cachapinta”. A interpretação dos resultados levou a associação desses híbridos a escapes de pisciculturas e pesque-pague, pelo fato da piscicultura priorizar a produção dessa linhagem, graças ao melhor desempenho em relação a taxas de crescimento e desenvolvimento (Porto-Foresti *et al.*, 2010; Campos, 2010), além da maior facilidade de reprodução com a cachara sendo fêmea por possuir maior período reprodutivo e melhor resposta hormonal (Resende *et al.*, 1996; Godinho, 2007; Campos, 2010).

Híbridos avançados também foram identificados, entretanto, em menor quantidade quando comparada as espécies puras e híbridos F1. Os autores associaram a ocorrência dos híbridos pós-F1 à fertilidade comprovada por Prado *et al.*, 2012b, via análise citogenética, e

corroborada por Freitas-Souza *et al.*, 2022, com a identificação molecular de ovos e larvas de híbridos, que possibilita a geração dessa linhagem por retrocruzamentos.

Na análise de amostras mais recentes, coletadas entre os anos de 2018 e 2024, e utilizadas nesse trabalho, pudemos verificar divergências em relação aos resultados obtidos. A ausência da linhagem híbrida F1 e predominância de híbridos avançados, até mesmo em comparação com as espécies parentais puras, demonstram o domínio das linhagens híbridas e redução das populações naturais de *P. corruscans* puros, condição já observada por José Augusto Senhorini, que afirmou em Prado *et al.*, 2012, ser rara a captura de pintados puros na natureza.

Além das diferenças já citadas, os espécimes carregavam, em sua maioria, o gene mitocondrial de *P. corruscans*, logo pertencentes a linhagem dos “pintacharas”. No entanto, como todos os híbridos são de gerações avançadas, sua origem não provém do cruzamento entre as espécies parentais puras (*P. corruscans* ♀ X *P. reticulatum* ♂), e sim entre linhagens avançadas de híbridos ou retrocruzamentos com a espécie parental *P. corruscans*, caso que favorece a introgressão genética.

A falta de identificação de híbridos F1, a abundância de gerações avançadas e a baixa ocorrência de “cachapintas” (linhagem de melhor desempenho na piscicultura), corroboram a ideia de que os espécimes analisados não provêm de escapes da piscicultura, principal dispersora de híbridos (Orsi & Agostinho, 1999; Fernandes *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2012). A fertilidade dos híbridos (Prado *et al.*, 2012b; Freitas-Souza *et al.*, 2022) correlacionada com incidência alarmante de híbridos avançados, apresentam grandes indícios que nos leva a crer que no cenário atual, os híbridos estão se reproduzindo entre si e retrocruzando, levando a perpetuação de suas populações compostas por “misturas” de genes de diferentes espécies.

A condição atual dos híbridos é resultado de dois principais fatores: o manejo indevido e a falta de bases legislativas específicas (Hashimoto *et al.*, 2014; Nobile *et al.*, 2020), que regulamentem sua produção para um formato mais sustentável. Mesmo com produções acadêmicas anteriores sinalizando sobre as complicações da não contenção dos escapes para o meio ambiente, medidas cabíveis não foram tomadas e o problema persistiu, concretizando as consequências ambientais e genéticas, antecipadas por pesquisadores da área.

5.1.1 Análise comparativa dos dados de híbridos no rio Mogi-guaçu

Nos trabalhos de Prado *et al.*, 2012, 2017, o rio Mogi-guaçu foi um dos pontos de coleta, tendo colaborado com um número amostral de n=10 e n=43, respectivamente. No presente trabalho, o rio Mogi-guaçu também esteve sob análise, e contribuiu com 11 amostras.

Os resultados adquiridos podem ser comparados diretamente para verificar o avanço de gerações híbridas no rio Mogi-guaçu (Tabela 10).

Tabela 10: comparação de resultados do levantamento de híbridos no rio Mogi-guaçu.

Bibliografia	Rio	Período de coleta	n	<i>P. corruscans</i>	<i>P. reticulatum</i>	H. F1	H. pós-F1
Prado <i>et al.</i> , 2012	Mogi-guaçu	2003 - 2008	10	5	0	4	1
Prado <i>et al.</i> , 2017		1998 - 2011	43	11	14	10	8
<i>presente trabalho</i>		2023 - 2024	11	1	3	0	7

n: número amostral; H.F1: híbridos da linhagem F1; H. pós-F1: híbridos pós F1

Como o número amostral entre os trabalhos é divergente, para fazer a análise comparativa é necessário ver a proporção de cada linhagem sobre quantidade total das amostras (Tabela 11). Dessa forma temos:

Tabela 11: Proporção de cada linhagem sobre o total amostrado

Bibliografia	Rio	Período de coleta	n	<i>P. corruscans</i>	<i>P. reticulatum</i>	H. F1	H. pós-F1
Prado <i>et al.</i> , 2012	Mogi-guaçu	2003 - 2008	100%	50%	0	40%	10%
Prado <i>et al.</i> , 2017		1998 - 2011	100%	25,60%	32,60%	23,30%	18,60%
<i>presente trabalho</i>		2023 - 2024	100%	9,10%	27,30%	0	63,60%

n: número amostral; H.F1: híbridos da linhagem F1; H. pós-F1: híbridos pós F1

Os dados dos levantamentos de híbridos no rio Mogi-guaçu supõe que, provavelmente, houve a adaptação e fixação ao local por parte dos híbridos, visto que nas análises mais recentes o grupo dos híbridos avançados é majoritário.

Podemos interpretar os resultados como uma cronologia da situação dos híbridos nesse ambiente. No início tínhamos híbridos sendo introduzidos via escape, muito comuns no rio Mogi-guaçu devido à forte presença de tanques de pesca esportiva nas margens do rio (Freitas-Souza *et al.*, 2022). Com o tempo, por possuírem a capacidade de se reproduzirem (Prado *et al.*, 2012; Freitas-Souza *et al.*, 2022), esses indivíduos começaram a dominar espaços antes habitados por estoques selvagens, fato observado pela elevada presença de híbridos avançados na região.

5.2 Híbridos avançados e introgressão genética

Nos resultados obtidos, todos os híbridos foram identificados como pertencentes a linhagem avançada ou pós-F1, circunstância que acende um alerta em relação aos estoques naturais de *P. reticulatum* e, principalmente, de *P. corruscans*, por acarretarem altas taxas de introgressão genética.

O cenário atual preocupante está diretamente relacionado com as áreas de estudo sob análise, tendo em vista que os rios onde foram coletados os exemplares atravessam as regiões metropolitanas e agrícolas mais desenvolvidas do Brasil (Brasil, 2023), e que são protagonistas na produção aquícola (Brasil, 2022). A bacia do Alto rio Paraná, inclusive, abriga uma das maiores concentrações de espécies não nativas entre todas as bacias brasileiras, em consequência das ações antrópicas (Brasil, 2023).

Os rios de coleta apresentam em sua extensão, muitos empreendimentos ligados a produção de alevinos, com destaque para o rio Grande, considerado um polo produtivo consolidado na produção em tanque-de-rede (EMBRAPA, 2021), método com grande potencial de escape. Além dele, os rios Pardo e Mogi-guaçu também são contribuintes para o setor aquícola, em menor escala. Nesse contexto, e sabendo que as práticas de manejo, na maioria das vezes, não ocorrem de forma adequada, temos ambientes naturais em constante contaminação.

A constância nos escapes junto as alterações na fisionomia ambiental, em especial a instalação de hidrelétricas no curso dos rios, criou um ambiente propício para perpetuação dos híbridos introduzidos pela piscicultura, sendo eles, atualmente dominantes nas regiões, segundo as amostras analisadas. Devido a fertilidade dos híbridos, a consequência dos escapes é agravada pois torna viável a introgressão genética (Porto-Foresti *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2012b), fenômeno no qual alelos são transferidos de uma espécie a outra por meio do retrocruzamento, podendo causar a perda de alelos ou rearranjos de combinações ligadas a adaptação ao ambiente (Laikre *et al.*, 1999; Allendorf *et al.*, 2001). Além disso, em casos mais graves, a diluição dos genomas parentais pode ser tão severa que leva a extinção genética, isto é, as espécies puras, geneticamente distintas, deixam de existir e são substituídas por populações híbridas ("*hybrids swarm*") de composição genética variável (Huxel, 1999; Epifanio

& Philipp, 2001; Muhlfeld *et al.*, 2009; Allendorf *et al.*, 2010; Hirashiki *et al.*, 2021; Curto *et al.*, 2022).

Baseado nos resultados obtidos, a preocupação em relação a conservação da espécie *P. corruscans* na bacia do Alto rio Paraná aumenta consideravelmente, pois os dados nos mostram que o processo de introgressão está em níveis avançados, reduzindo a presença da espécie puras e progredindo para uma possível extinção genética.

5.3 Queda populacional nos estoques naturais de *P. corruscans*

O *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), entrou para a lista nacional de espécies ameaçadas de extinção no ano de 2022 (Brasil, 2022), decisão baseada na avaliação populacional que demonstrou queda de pelo menos 30% em relação a população de 45 anos atrás (três tempos geracionais) (ICMBio, 2019). A principal ameaça, levantada por especialista, foi a instalação de barramentos para a construção de hidrelétricas (ICMBio, 2022), que afetam diretamente na reprodução da espécie (Bignotto *et al.*, 2009), caracterizada por migrar longas distâncias durante o período reprodutivo (Resende, 2003; Godinho *et al.*, 2007). Apesar do destaque dado aos barramentos, a espécie ainda é diretamente ameaçada pela poluição ambiental de seus habitats, sobrepesca e hibridação (Brasil, 2023).

A queda populacional já foi registrada por diversos autores, que relatam dificuldade de captura e até desaparecimento em certas regiões. Nogueira & Sá (2015), afirmam que a espécie não é mais presente a jusante da barragem de Xingó, na bacia do rio São Francisco. Orsi *et al.* (2010), evidenciam o desaparecimento nas porções média e alta do rio Paranapanema, enquanto nas porções baixas ainda é encontrada, mas com baixa frequência (Jardulli *et al.*, 2020). Vilela & Maciel (2014), expõem a percepção dos pescadores de Jupiá,

Três Lagoas/MS “o pintado ficou com o preço alto por não ter ele. Então quando tem...é um peixe tão procurado que se torna quase um leilão, as pessoas colocam preço nele, porque é um peixe eu não ta tendo”. Já, José Augusto Senhorini, salientou, em Prado *et al.*, 2012, ser rara a captura de *P. corruscans* puros.

O presente trabalho obteve baixa frequência de indivíduos puros em todos os rios analisados, portanto, corrobora com as evidências de queda populacional da espécie *P. corruscans*, enfatizando as consequências e danos genéticos e ecológicos, ocasionados pela interação biológica entre as espécies puras e os híbridos.

No I Seminário Pró-Pardo - José Senhorini (*In memoriam*), evento organizado pelo ICMBio/CEPTA, que contou com a participação dos colaboradores do projeto Pro-Pardo, este trabalho foi apresentado por integrar o PAN Alto Paraná, uma das 6 ações do Pro-Pardo. Nas discussões, após apresentação dos resultados, foi levantado a proposição sobre a evolução da situação de risco do pintado, atualmente na categoria de espécie vulnerável no livro vermelho.

Cabe destacar que houve a proibição da pesca do pintado, logo após sua inclusão na lista de espécies ameaçadas, entretanto, no mesmo ano (2022), sua pesca foi liberada com limitações e critérios impostos pelo Plano de recuperação do surubim ou pintado (*Pseudoplatysoma corruscans*) (ICMBio, 2022). Entre os parâmetros impostos para a captura temos o tamanho ideal e períodos de defeso, específicos para cada bacia em que o pintado se encontra. Deve ser enfatizado que a pesca dos híbridos de surubins, está liberada, porém, sua morfologia externa similar à de seus parentais dificulta a diferenciação entre as espécies de pesca proibida, os puros, e seus respectivos híbridos (Porto-Foresti *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011).

5.4 Perspectivas das populações híbridas

A partir da identificação majoritária de híbridos pós-F1 atrelada a baixa incidência de puros, torna-se evidente que o processo de substituição das populações puras está em andamento e já em fase avançada. Temos, portanto, locais antes habitados por estoques naturais puros e íntegros, sendo ocupados por indivíduos de perfil genético variável, composto pela mistura de genes das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*. O cenário observado evidencia que os híbridos vêm superando a seleção ambiental, completando o seu ciclo biológico e persistindo, indefinidamente, com a introgressão das populações selvagens (Prado *et al.*, 2011b).

Nas condições atuais, o controle biológico é complexo e, possivelmente, irreversível. Com os híbridos sendo capazes de fazer a manutenção de suas populações, os escapes ainda persistindo e a falta de amparo legislativo, temos uma situação difícil de ser contornada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho consiste em uma avaliação ambiental que demonstrou a partir da aplicação de marcadores moleculares a presença expressiva de híbridos avançados nos rios do Alto Paraná e a redução considerável das populações selvagens de *P. corruscans*.

Fundamentado nos dados adquiridos, temos a sustentação da importância da identificação por marcadores moleculares, já que a morfologia dos indivíduos pode gerar constatações erradas, pela similaridade entre os parentais e os híbridos (Porto-Foresti *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2011), e a exposição das graves consequências ocasionadas

substancialmente pelos escapes e introduções indevidas da piscicultura (Welcomme 1988; Simberloff *et al.*, 2021; Kang *et al.*, 2023).

Os comprometimentos ambientais e genéticos são complexos e dificilmente podem ser recuperados, principalmente, levando em consideração que não há nenhum amparo legislativo ou fiscalização (Hashimoto *et al.*, 2014; Nobile *et al.*, 2020), que auxilie no controle de escapes, mesmo com diversos estudos alertando sobre os prejuízos ambientais ligados a introdução dos híbridos.

A falta de leis que delimitem a produção e o manejo dos híbridos, torna ainda mais essencial a atuação de órgãos públicos ambientais na tentativa de conter os impactos negativos e restaurar o equilíbrio ecológico. O ICMBio/CEPTA promove e investe nos Planos de Ação Nacional para a Conservação de Espécies Ameaçadas de Extinção – PANs, com o intuito de prevenir e mitigar impactos sobre as espécies em risco. Esse trabalho colabora com o PAN Alto Paraná, realizando o levantamento da frequência de híbridos na natureza, que representam uma ameaça direta a uma das espécies alvo, o pintado. Assim como, auxilia na avaliação da situação dos estoques naturais da espécie *P. corruscans* avaliada em situação de vulnerabilidade pelo ICMBio em 2022.

Uma tática para cessar o avanço dos híbridos e favorecer as populações da espécie *P. corruscans*, seria realizar o repovoamento, com indivíduos de identificação apurada molecularmente, e liberar a pesca total dos bagres híbridos. O impasse desse plano de recuperação está relacionado com a diferenciação entre as espécies puras e linhagens híbridas, que ainda não apresentam um método rápido, confiável e eficiente, que seja acessível para aqueles que realizam a pesca e captura desses bagres.

O ato conjunto entre as instituições de pesquisa e os órgãos públicos ambientais é essencial para o fornecimento de subsídios que permitem a elaboração de alternativas para

planos de conservação e recuperação cada vez mais precisos. Portanto, é fundamental que haja o vínculo colaborativo entre essas entidades para assegurar a implementação de estratégias eficazes de conservação e manejo ambiental, embasadas em dados científicos confiáveis.

7 REFERÊNCIAS

- ALLENDORF, F. W., et al.** The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 11, p. 613–622, 2001.
- ALVES, A. L., et al.** *Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos*. Palmas (TO): Embrapa Pesca e Aquicultura (Documentos), 3 58 p. 2014.
- ARAUJO-LIMA, C. A. R., et al.** Migratory fishes of the Brazilian Amazon En: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C (Eds.). *Migratory Fishes of South America: Biology. Fisheries and Conservation Status*. Canada, 2003.
- ARNOLD, M. L.** *Natural hybridisation and evolution*. New York: Oxford University Press, 1997.
- AVISE, J. C.** Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 42, p. 312–325, 1986.
- BARTLEY, D. M., et al.** *The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 10, p. 325–337, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1012299720008>.
- BERNARDINO, G., et al.** *Reprodução artificial do Tambaqui, Colossoma macropomum: síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero Colossoma*. CEPTA, Projeto Acuicultura/Brasil, 56 p. CCS/USP, São Paulo, 1998.
- BIGNOTTO, T. S., et al.** Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, p. 681–689, 2009.
- BRASIL.** Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA). *Boletim da Aquicultura em Águas da União 2022*. Brasília: ANA, 2022.

- BRASIL.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). *Produção aquícola em tanques-rede: panorama e manejo*. Brasília: Embrapa, 2021.
- BRASIL.** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). *Ficha de avaliação do risco de extinção do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)*. Brasília, DF: ICMBio, 2019.
- BRASIL.** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). *Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná*. Brasília: ICMBio, 2023.
- BRASIL.** Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011*. Brasília: MPA, 2013.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura.** *Censo Aquícola Nacional*. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura 336 p. 2008.
- BROUGHTON, R. E., et al.** Current and historical hybridization with differential introgression among three species of cyprinid fishes (genus *Cyprinella*). *Genetica*, v. 139, n. 5, p. 699–707, 2011.
- BITRAGO-SUÁREZ, U. A., et al.** Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Blecker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, v. 1512, n. 1, p. 1–38, 2007.
- CAMPOS, J. L.** O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix & Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: **BALDISSEROTTO, B.;** 2010
- GOMES, L. C.** (Eds.). *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil* p. 335–361. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

- CAMPTON, D. E.** Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretations. In: **RYMAN, N.; UTTER, F.** (Eds.). *Population Genetics and Fishery Management*. p. 161–192. Seattle: University of Washington Press, 1987.
- CAO, L., et al.** rDNA and mtDNA analysis for the identification of genetic characters in the hybrid grouper derived from hybridization of *Cromileptes altivelis* (female)× *Epinephelus lanceolatus* (male). **BMC Genomic Data**, v. 25, n. 1, p. 5, 2024.
- CAROLSFELD, J.** *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. Idrc, 2003.
- CARVALHO, D. C. de., et al.** *Molecular identification of fishes: the case of Surubim (Pseudoplatystoma spp.). Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 4, p. 215-219, out./dez. 2008.
- CIOFI, C., et al.,** Development of a multiplex PCR assay for fine-scale population genetic analysis of the Komodo monitor *Varanus komodoensis* based on 18 polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, n. 3, p. 550–556, 2011.
- CREPALDI, D. V., et al.** O surubim na aquacultura do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 30, n. 3/4, p. 150–158, 2007.
- CURTO, M., et al.** *Widespread hybridization between invasive bleak (Alburnus alburnus) and Iberian chub (Squalius spp.): A neglected conservation threat. Fishes*, v. 7, p. 247, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.3390/fishes7110247>.
- DÍAZ-ARCE, N., et al.** Unidirectional trans-Atlantic gene flow and a mixed spawning area shape the genetic connectivity of Atlantic bluefin tuna. **Molecular Ecology**, v. 33, n. 1, p. e17188, 2024.

- DIYIE, R. L., et al.** Genetic variations among different generations and cultured populations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Ghana: Application of microsatellite markers. *Aquaculture*, v. 544, p. 737070, 2021.
- DOEBLEY, J. F., et al.** *The molecular genetics of crop domestication*. *Cell*, v. 127, n. 7, p. 1309-1321. 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.12.006.
- EMBRAPA.** *Aquicultura brasileira cresce 123% em dez anos*. 13 dez. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos>. Acesso em: 07 de outubro de 2025
- EPIFANIO, J.; PHILIPP, D.** 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*, v. 10, p. 339–354, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1012299720015>.
- FAO.** *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024: Blue Transformation in Action*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2024. DOI: <https://doi.org/10.4060/cc9938en>.
- FERNANDES, R., et al.** Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v. 25, n. 1, p. 115–120, 2003.
- FERREIRA, M., et al.** *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. Ed. 220 p. Brasília (DF): EMBRAPA – CENARGEM, 1998.
- FØRE, H. M., et al.** Causal analysis of escape of Atlantic salmon and rainbow trout from Norwegian fish farms during 2010–2018. *Aquaculture*, v. 532, p. 736002, 2021. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736002.

- FRANCO, A. C. S., et al.** Invasive peacock basses (*Cichla spp.*) and decreased abundance of small native fish in Brazilian reservoirs. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v. 32, n. 11, p. 1852-1866, 2022.
- FREITAS-SOUZA, Diogo., et al.** Genetic markers indicate that hybrids of *Pseusolatystoma* (Siluriformes, Pimelodidae) are reproducing in natural environments in southeastern Brazil. *Biological Invasions*, v. 24, 1040-1058 (2022).
- GARLOCK, T., et al.** A global blue revolution: aquaculture growth across regions, species, and countries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, v. 28, n. 1, p. 107–116, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1678111>
- GODINHO, A. L., et al.** Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, v. 80, p. 421–433, 2007.
- HASHIMOTO, D. T., et al.** Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: risks for aquaculture production. *Neotropical Ichthyology*, v. 14, n. 2, e150139, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20150139>.
- HASHIMOTO, D. T., et al.** Marcadores de DNA no monitoramento genético de híbridos interespecíficos de peixes. *Panorama da Aquicultura*, set./out. 2011b, p. 48–53.
- HASHIMOTO, D. T., et al.** Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. *Reviews in Aquaculture*, v. 4, p. 108–118, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01052.x>
- HASHIMOTO, D. T., et al.** Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. *Aquaculture Research*, v. 44, n. 6, p. 876-884, 2013a.

- HASHIMOTO, D. T. et al.** Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: risks for aquaculture production. *Neotropical Ichthyology*, v. 14, n. 02, p. e150139, 2016.
- HASHIMOTO, D. T., et al.** Genetic identification of F1 and post-F1 Serrasalminidae juvenile hybrids in Brazilian aquaculture. *PloS one*, v. 9, n. 3, p. e89902, 2014.
- HILSDORF, A. W. S., et al.** Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 1, p. 317–324, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011001300033>.
- HIRASHIKI, C., et al.** Concern over hybridization risks should not preclude conservation interventions. *Conservation Science and Practice*, v. 3, n. 4, p. e424, 2021.
- HUANG, Y., et al.** Fish genomics and its application in disease-resistance breeding. *Reviews in Aquaculture*, v. 17, p. e12973, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12973>.
- HUXEL, G. R.** Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation*, v. 89, n. 2, p. 143–152, 1999.
- INOUE, L. A. K. A. et al.** Princípios básicos para produção de alevinos de surubins (Pintado e Cachara). 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE).** Produção da pecuária municipal 2013. *Produção Pecuária Municipal*, v. 41, 2013.
- JARDULI, L. R. et al.** Fish fauna from the Paranapanema River basin, Brazil. *Biota Neotropical*, v. 20, n. 1, e20180707, 2020.
- JENSEN, Ø., et al.** Escapes of fishes from Norwegian sea-cage aquaculture: causes, consequences and prevention. *Aquaculture Environment Interactions*, v. 1, n. 1, p. 71-83, 2010.

- JÚLIO JÚNIOR, H. F., et al.** A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, p. 709-718, 2009.
- KANG, B., et al.** Introduction of non-native fish for aquaculture in China: A systematic review. *Reviews in Aquaculture*, v. 15, n. 2, p. 676-703, 2023.
- KANG, J. H., et al.** Microsatellite analysis as a tool for discriminating an interfamilial hybrid between olive flounder and starry flounder. *Genetics and Molecular Biology*, v. 10, n. 4, p. 2786–2794, 2011.
- LIMA, F. P., et al.** Occurrence of Serrassalmidae hybrid fish in the Amazon River basin, Brazil. *Oecologia Australis*, v. 23, n. 1, 2019.
- LIU, Z., et al.** Multiple trait comparison and global intestine transcriptional provide new insights into bases of heterosis in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: Genomics and Proteomics*, v. 50, p. 101236, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpd.2024.101236>.
- LUNDBERG, J. G., et al.** Family Pimelodidae. In: **REIS, R. E.; KULLANDER**, *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* p. 432–446. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- FERRARIS JR, C. J. (Orgs.).** *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* p. 432–446. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- MAKRAKIS, S., et al.** The Canal da Piracema at Itaipu Dam as a fish pass system. *Neotropical Ichthyology*, v. 5, p. 185-195, 2007.
- MATEUS, L. A. F., et al.** Dinâmica populacional de quatro espécies de grandes bagres na bacia do rio Cuiabá, Pantanal Norte, Brasil (Siluriformes, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 24, n. 1, p. 87–98, 2007.
- MAYR, E.** The breakdown of isolating mechanisms (hybridisation). In: **MAYR, E. (Ed.).** *Animal species and Evolution*, p. 110–135. Cambridge, MA: Belknap Press, 1963

- MELLO, P. H., et al.** Threatened fishes of the world: *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes*, v. 85, n. 4, p. 359–360, 2009.
- MORITZ, C., et al.** Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 18, p. 269–292, 1987.
- MORO, G. V., et al.** *Espécies de peixe para piscicultura*, 40 p. (Documentos, 4. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2013.). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/976004>. Acesso em: 29 out. 2025.
- MOYER, G. R., et al.** Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 140, p. 551–575, 2004.
- MUHLFELD, C., et al.** 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*, v. 66, n. 7, p. 1153–1168, 2009.
- NESTLER, J. M. et al.** The River Machine: A template for fish movement and habitat, fluvial geomorphology, fluid dynamics, and biogeochemical cycling. *River Research and Applications*, v. 28, p. 490–503, 2012.
- NICOLOSI, G., et al.** Aliens in caves: the global dimension of biological invasions in subterranean ecosystems. *Biological Reviews*, v. 98, p. 849–867. 2023 DOI: 10.1111/brv.12933.
- NOBILE, A. B., et al.** Status and recommendations for sustainable freshwater aquaculture in Brazil. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 3, p. 1495–1517, 2020.

- NOGUEIRA, E. M. S., et al.** *A pesca artesanal no baixo São Francisco: atores, recursos, conflitos* 217 p. Petrolina: Sociedade Brasileira de Ecologia Humana, 2015.
- OLDEN, J. D., et al.** Ecological processes driving biotic homogenization: testing a mechanistic model using fish faunas. *Ecology*, v. 85, n. 7, p. 1867-1875, 2004.
- ORSI, M. L., et al.** Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 16, n. 2, p. 557–560, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000200031>.
- ORSI, M. L.** Estratégias reprodutivas de peixes: estratégias reprodutivas de peixes da região média-baixa do rio Paranapanema, 114 p. *Reservatório de Capivara*. São Paulo: Blucher, 2010
- ORSI, M. L. et al.** Ovos, larvas e juvenis dos peixes da bacia do Paranapanema: uma avaliação para a conservação. 140 p. São Paulo: Triunfal Gráfica & Editora Assis, 2016.
- PALUMBI, S. R.** Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS, D.; MORITZ, C.; MABLE, B. (ed.). *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer Associates Inc., p. 205–247. 1996.
- PEREIRA, G. V., et al.** *Vaccination strategies with oral booster for surubim hybrid (Pseudoplatystoma corruscans × Pseudoplatysroma reticulatum)*. *Aquaculture Research*, v. 46, p. 1831-1841, 2015. DOI: 10.1111/are.12339.
- PORTO-FORESTI, F., et al.** Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. *Journal of Applied Ichthyology*, 2013. DOI: 10.1111/jai.12092.
- PORTO-FORESTI, F., et al.** A hibridação interespecífica em peixes. *Panorama da Aquicultura*, p. 28–33jul./ago. 2011.

- PORTO-FORESTI, F., et al.** Hibridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. In: Baldisserotto B, Gomes LC (eds) *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, pp. 589-606. 2010
- PORTO-FORESTI, F., et al.** Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 195-202, 2008.
- PRADO, F. D., et al.** Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture Research*, v. 42, p. 1890–1894, 2011a. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02819.x>.
- PRADO, F. D., et al.** Híbridos interespecíficos de peixes em ambientes naturais. *Panorama da Aquicultura*, p. 30–41. nov./dez. 2011b
- PRADO, F. D., et al.** Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *Fisheries Research*, v. 125, p. 300-305, 2012.
- PRADO, F. D., et al.** Development and characterization of 16 microsatellites for the Neotropical catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* and cross species analysis. *Conservation genetics resources*, v. 6, n. 3, p. 679-681, 2014.
- PRADO, F. D., et al.** Hybridization and genetic introgression patterns between two South American catfish along their sympatric distribution range. *Hydrobiologia*, v. 788, n. 1, p. 319-343, 2017.
- RAHMAN, M. A., et al.** Hybridization and its application in aquaculture. *Sex control in aquaculture*. p. 163–178. 2018.
- RESENDE, E. K.** Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin excluding the Upper Paraná Basin. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). *Migratory Fishes of South*

America: Biology, Fisheries and Conservation Status. p. 99–156. Victoria: World Fisheries Trust, 2003.

RESENDE, E. K., et al. Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul. Corumbá, MS: EMBRAPA – CPAP. Boletim de Pesquisa 02. 1996

RHYMER, J. M., et al. Extinction by hybridisation and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 27, p. 83–109. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>. 1996.

SALES, N. G. et al. Introgression from non-native species unveils a hidden threat to the migratory Neotropical fish *Prochilodus hartii*. *Biological Invasions*, v. 20, n. 3, p. 555-566, 2018.

SANZ, N., et al. Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conservation Genetics*, v. 10, n. 1, p. 225–236, 2009.

SATO, Y., et al. Reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) da bacia do São Francisco. In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA, 6, Belo Horizonte. *Resumos...* Belo Horizonte: Associação Mineira de Aquicultura – AMA. p. 20. 1988

SCHWARTZ, M. K., et al. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 22, n. 1, p. 25–33, 2007.

SIMBERLOFF, D. et al. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in ecology & evolution*, v. 28, n. 1, p. 58-66, 2013.

SIMBERLOFF, D. Maintenance management and eradication of established aquatic invaders. *Hydrobiologia*, v. 848, n. 9, p. 2399-2420, 2021.

- SISTIAGA, M., et al.** Prediction of size-dependent risk of salmon smolt (*Salmo salar*) escape through fish farm nets. *Aquacultural Engineering*, v. 89, p. 102061, 2020. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2020.102061.
- SOUTO CAVALLI, L., et al.** Mudança de hábito no consumo de pescado passa por mais informação. Seafood Brasil, 19 nov. 2021. Disponível em: <https://seafoodbrasil.com.br/mudanca-de-habito-no-consumo-de-pescado-passa-por-mais-informacao>. Acesso em: 07 de outubro de 2025
- SOUZA, R. C. C. L. de., et al.** Impacto das espécies invasoras no ambiente aquático. *Ciência e cultura*, v. 61, n. 1, p. 35-41, 2009.
- TOLEDO-FILHO, S. A., et al.** Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. *Cadernos de Ictiogenética*, v. 2, CCS/USP, São Paulo, 1994.
- TOLEDO-FILHO, S. A., et al.** Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética*, v. 4. CCS/USP, São Paulo, 56 pp. 1998
- TURRA, E. M., et al.** Ferramentas para o melhoramento genético de peixes em águas interiores. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 10Uberaba. Anais [...]. Uberaba: SBMA, 2013. 12 p., 2013.
- VAINI, J. O. et al.** Genetic identification of interspecific hybrid of Neotropical catfish species (*Pseudoplatystoma corruscans* vs. *Pseudoplatystoma reticulatum*) in rivers of Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 12, n. 03, p. 635-641, 2014.
- VALLADÃO, G. M. R., et al.** South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 2, p. 351–369, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12162>.
- VILELA, M. J. A., et al.** Aspectos da pesca segundo os pescadores de Jupia, Três Lagoas, Mato Grosso do Sul: 1998–1999. In: PALMA, V. C. L. C. F.; ALMEIDA, D.; SILVA, A. J. (Orgs.).

Universidade da Melhor Idade, v. 3. p. 253–263. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2014.

VU, Q. T., *et al.* Phylogenetic and genetic diversity of Serranidae species from the South China Sea based on COI sequences. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, v. 17, n. 5, p. 2175-2188, 2024.

WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. *Food & Agriculture Org.*, 1988.

YABU, M. H. S. *et al.* First record of non-native hybrid catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus* in the Upper Paraná River basin, Brazil. *Journal of fish biology*, v. 92, n. 1, p. 261-267, 2020.

