

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

***Diogo Teruo Hashimoto***

**APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO  
MONITORAMENTO GENÉTICO DE PROGRAMAS DE HIBRIDAÇÃO  
INTERESPECÍFICA EM PISCICULTURAS BRASILEIRAS**

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

***Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti***

Botucatu, 2011

“Tentemos *ensinar* generosidade e altruísmo, porque nascemos egoístas. Compreendamos o que nossos próprios genes egoístas tramam, porque assim, pelo menos, poderemos ter a chance de frustrar seus intentos, uma coisa que nenhuma outra espécie jamais aspirou fazer.”

(Richard Dawkins)

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Akira e Yurico, por todo o esforço e  
dedicação para minha formação  
pessoal e profissional.*

## **Agradecimentos**

---

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

*À Pós-Graduação de Ciências Biológicas (AC: Genética), da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, que possibilitou o desenvolvimento do Doutorado.*

*Ao Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Bauru, pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido.*

*Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti, que esteve presente em toda minha carreira científica, orientando com responsabilidade todas as fases do projeto e, principalmente, agradeço pelas oportunidades fornecidas e amizade que foram essenciais para a minha formação.*

*Ao Prof. Dr. Jehud Bortolozzi, pelas valiosas discussões que me ensinaram o que realmente significa genética, além dos momentos descontraídos de laboratório.*

*Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, por todo o indispensável suporte na execução deste trabalho e pelas oportunidades que foram fundamentais para o meu aprimoramento acadêmico.*

*Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, que gentilmente cedeu os equipamentos do laboratório para análises de parte do projeto.*

*Ao Prof. Dr. José Augusto Senhorini, pelos ensinamentos sobre reprodução de peixes e cultivo de híbridos interespecíficos.*

*Ao Prof. Dr. Malcolm Ferguson-Smith e toda sua equipe, por me acolher na University of Cambridge e pelo auxílio nas análises citogenéticas.*

*Aos amigos do Laboratório de Genética de Peixes (UNESP - Bauru), Andrea, Bruna, Carol, Isabela, Manolo, Rosângela e Sandro, em especial Tatiana e Fernanda, por toda a ajuda e por compartilharem os momentos de laboratório.*

*Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial ao Renato Devidé e Dr. Fernando Mendonça, que me auxiliaram nas coletas e análises moleculares.*

*Aos amigos Dr<sup>a</sup>. Daniela Ferreira e Dr. José Pansonato-Alves, pelos incentivos, momentos de convivência e pelas correções deste trabalho.*

*Aos amigos do LABCAM, em especial Gabriel, Mateus e Thiago, pelos momentos descontraídos, que são fundamentais para a carreira acadêmica.*

*Aos meus amigos Octávio Antunes e Sandro Daniel, por me auxiliarem nas coletas.*

*À minha namorada Sabrina e família, que estiveram presente em toda minha formação. Obrigado Sabrina pelo indispensável amor, conforto e por compartilhar todos os momentos com alegria.*

*Aos meus amigos pessoais e minha família, Akira, Yuri, Sandra e família de meu irmão Marcelo, pela confiança em mim depositada e por acreditarem no meu potencial, e principalmente pelo esforço e dedicação para a minha formação.*

## RESUMO

Híbridos de peixes produzidos em pisciculturas são considerados eminentes ameaças biológicas às populações naturais e estoques cultivados. Podem apresentar fertilidade e contaminar geneticamente os estoques através de introgressão. Neste trabalho, estabelecemos e utilizamos marcadores de PCR-Multiplex e PCR-RFLP com genes nucleares e mitocondriais para a identificação de híbridos entre espécies Neotropicals atualmente produzidos nas pisciculturas brasileiras. Entre estes, estão cruzamentos envolvendo espécies de Anostomidae (*Leporinus macrocephalus* e *L. elongatus*), Serrasalminidae (*Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e *P. brachypomus*) e Pimelodidae (*Pseudoplatystoma reticulatum*, *P. corruscans*, *Phractocephalus hemiliopterus* e *Leiarius marmoratus*). A identificação molecular foi realizada em 23 lotes de juvenis de peixes (cerca de 1850 amostras), comprados vivos (de 2 a 18 cm) em oito diferentes pisciculturas brasileiras. Foram adquiridos tanto indivíduos de espécies puras quanto produtos híbridos. Os resultados indicaram que 15 lotes apresentaram-se irregulares e não foram vendidos conforme especificado, pois não correspondiam ao que foi comercializado pelos produtores. Nestes lotes, amostras de diferentes híbridos e espécies estavam misturadas, com casos de até cinco diferentes produtos no mesmo estoque. Além disso, os lotes foram vendidos com rótulos inadequados, observando produtos híbridos comercializados como espécies puras de forma não discriminada. A situação é preocupante em relação aos híbridos provenientes de espécies de Serrasalminidae e Pimelodidae, pois foram comercializados erroneamente em alta proporção. Além do mais, quatro lotes foram identificados como linhagens pós-F1, provenientes de retrocruzamentos envolvendo os produtos híbridos “Patinga” e “Cachapinta”. Estes animais apresentam fertilidade e são encontrados em ambientes naturais, provavelmente oriundos de escapes de sistemas de cultivo. Adicionalmente, a análise do plantel de matrizes de uma piscicultura comprovou que híbridos estão sendo utilizados como reprodutores nas pisciculturas, inclusive indivíduos pós-F1, que causarão danos financeiros a estes empreendimentos. Os dados mostram que a produção, manejo e comércio de peixes, em especial de híbridos, são realizados de forma descontrolada nas pisciculturas brasileiras. Como híbridos apresentam características morfológicas intermediárias às dos parentais, o principal obstáculo para tornar estas práticas monitoradas é a dificuldade de identificação pela análise morfológica, especialmente no estágio juvenil, a principal fase de comercialização. Nesse sentido, a aplicação dos métodos PCR-Multiplex e PCR-RFLP torna-se imprescindível, pois são técnicas rápidas e de baixo custo. Por fim, esses dados servirão como subsídios para um manejo adequado destes animais, permitindo um desenvolvimento sustentável da aquicultura.

## ABSTRACT

Fish hybrids produced in fish farms are considered eminent biological threats to natural populations and cultivated stocks. If fertile, they can cause genetic contamination of the stocks through introgression. In this work, we established and used molecular markers of PCR-Multiplex and PCR-RFLP with nuclear and mitochondrial genes for the identification of hybrids between Neotropical species currently produced in fish farms in Brazil. The crosses were performed between species of Anostomidae (*Leporinus macrocephalus* and *L. elongatus*), Serrasalminidae (*Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* and *P. brachypomus*) and Pimelodidae (*Pseudoplatystoma reticulatum*, *P. corruscans*, *Phractocephalus hemiliopterus* and *Leiarius marmoratus*). Molecular identification was carried out in 23 stocks of juvenile fish (about 1850 samples), purchased live (2-18 cm) in eight different fish farms in Brazil. Both individuals of pure species and hybrid products were acquired. The results indicated that 15 stocks were irregular and mislabeled, because they did not correspond to what was marketed by the producers. In these stocks, samples of different hybrids and species were mixed, with cases up to five different products in the same stock. Furthermore, the stocks were sold with inadequate labels, with hybrids traded as pure species indiscriminately. Particular concerns are revealed in relation to hybrids from species of Pimelodidae and Serrasalminidae, because they were incorrectly commercialized in high proportion. Moreover, four stocks were identified as post-F1 lineages, resulting from backcrosses of the hybrid products “Patinga” and “Cachapinta”. These animals are fertile and can be found in natural environments, probably originated from escapes of farming systems. Additionally, the molecular analysis showed that fish hybrids are being used as broodstock in fish farms, including post-F1 individuals, which will cause financial losses to these companies. The data show that the production, management and trade of fish, especially hybrids, are performed in an uncontrolled manner in fish farms in Brazil. Because hybrids have morphological characteristics intermediate to their parental species, the main obstacle to the proper monitoring is the difficulty in identifying through traditional taxonomic tools, especially at the juvenile stage, which is the main phase of marketing. Thus, the use of PCR-Multiplex and PCR-RFLP methods becomes essential, because are techniques of low cost and fast application. Finally, these data serve as framework for an appropriate handling of these animals, allowing a sustainable development of aquaculture.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                 | Pg.       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                             | <b>1</b>  |
| 1.1 Programas de hibridação interespecífica                                                                                                     | 2         |
| 1.1.1 Características gerais                                                                                                                    | 2         |
| 1.1.2 Considerações sobre os principais híbridos Neotropicais e suas espécies parentais                                                         | 4         |
| + Híbridos entre <i>Leporinus macrocephalus</i> e <i>L. elongatus</i>                                                                           | 4         |
| + Híbridos entre <i>Piaractus mesopotamicus</i> , <i>P. brachypomus</i> e <i>Colossoma macropomum</i>                                           | 5         |
| + Híbridos entre <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , <i>P. reticulatum</i> , <i>Leiarius marmoratus</i> e <i>Phractocephalus hemiliopterus</i> | 7         |
| 1.1.3 Riscos causados pela hibridação interespecífica                                                                                           | 9         |
| 1.2 Métodos na detecção de hibridação                                                                                                           | 11        |
| 1.2.1 Estudos citogenéticos na identificação de híbridos                                                                                        | 13        |
| 1.2.2 Estudos moleculares na identificação de híbridos                                                                                          | 13        |
| 1.3 Objetivos                                                                                                                                   | 15        |
| <b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                    | <b>16</b> |
| 2.1 Materiais                                                                                                                                   | 16        |
| 2.2 Métodos                                                                                                                                     | 27        |
| + Métodos para as análises citogenéticas                                                                                                        | 27        |
| 2.2.1 Estimulação de mitoses                                                                                                                    | 27        |
| 2.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos de peixes                                                                                               | 28        |
| 2.2.3 Obtenção de sondas específicas de DNA ribossomal 5S                                                                                       | 29        |
| 2.2.4 Hibridização fluorescente <i>in situ</i>                                                                                                  | 29        |
| 2.2.5 Estudos cariotípicos                                                                                                                      | 30        |
| 2.2.6 Montagem dos cariótipos                                                                                                                   | 31        |
| + Métodos de análises moleculares                                                                                                               | 31        |
| 2.2.7 Extração e purificação de DNA                                                                                                             | 32        |
| 2.2.8 Amplificação dos fragmentos gênicos mitocondriais e nucleares                                                                             | 33        |
| 2.2.9 Sequenciamento das amostras                                                                                                               | 35        |
| 2.2.10 Análises de PCR-Multiplex                                                                                                                | 36        |
| 2.2.11 Análises de PCR-RFLP                                                                                                                     | 37        |

|                                                                                                                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>3 RESULTADOS</b>                                                                                                                                               | <b>38</b>  |
| 3.1.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre <i>Leporinus elongatus</i> e <i>L. macrocephalus</i>                                              | 40         |
| 3.1.2 Identificação molecular dos estoques de Piauçu ( <i>Leporinus macrocephalus</i> )                                                                           | 46         |
| 3.2.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre <i>Colossoma macropomum</i> , <i>Piaractus mesopotamicus</i> e <i>Piaractus brachypomus</i>       | 49         |
| 3.2.2 Identificação molecular de lotes dos peixes serrasalmídeos                                                                                                  | 59         |
| 3.2.3 Identificação de híbridos pós-F1 em lotes de peixes serrasalmídeos                                                                                          | 67         |
| 3.3.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i>                                        | 77         |
| 3.3.2 Marcadores moleculares na identificação de híbridos pós-F1 entre <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i>                                 | 83         |
| 3.3.3 Identificação molecular de lotes de Pintado ( <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> )                                                                          | 91         |
| 3.3.4 Identificação molecular de um plantel de matrizes de Pintado e Cachara                                                                                      | 94         |
| 3.4.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , <i>Leiarius marmoratus</i> e <i>P. reticulatum</i>           | 98         |
| 3.4.2 Identificação molecular de lotes de “Cachandiá”                                                                                                             | 105        |
| 3.4.3 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , <i>Phractocephalus hemiliopterus</i> e <i>P. reticulatum</i> | 109        |
| 3.4.4 Identificação molecular do lote de “Cachapira”                                                                                                              | 116        |
| <b>4 DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                                | <b>119</b> |
| 4.1 Marcadores de PCR-RFLP e PCR-Multiplex na identificação dos híbridos                                                                                          | 119        |
| 4.2 Identificação molecular dos lotes comprados de pisciculturas                                                                                                  | 125        |
| 4.2.1 Identificação molecular dos estoques de Piauçu                                                                                                              | 128        |
| 4.2.2 Identificação molecular de lotes dos peixes serrasalmídeos                                                                                                  | 128        |
| 4.2.3 Identificação de híbridos pós-F1 em lotes de peixes serrasalmídeos                                                                                          | 130        |
| 4.2.4 Identificação molecular de lotes dos peixes pimelodídeos                                                                                                    | 133        |
| 4.2.5 Identificação molecular de um plantel de matrizes de Pintado e Cachara                                                                                      | 134        |
| <b>5 CONCLUSÕES</b>                                                                                                                                               | <b>137</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                                                               | <b>139</b> |

## **1 INTRODUÇÃO**

A aquicultura é considerada como um crescente setor de produção. No período compreendido entre 1970-2008, a produção de peixes pela aquicultura mundial vem aumentando a uma taxa média anual de 8,3%, o que revela que a aquicultura é o setor de mais rápido crescimento dos animais que servem de alimentos (FAO, 2010). No Brasil, segundo estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010), no período de 2007-2009, a aquicultura registrou um expressivo desenvolvimento, com um crescimento de 43,8%.

Dentro da aquicultura, a piscicultura corresponde à maior fração. Em 1998, por exemplo, a piscicultura alcançou 98% dos cultivos mundiais, correspondendo a uma produção de cerca de 17 milhões de toneladas de peixes de água doce (FAO, 2000). Já em 2008, este valor registrou a ordem dos 28,8 milhões de toneladas (FAO, 2010). No Brasil, em 2009, o setor da piscicultura correspondeu a 81% do total da aquicultura, com uma produção de mais de 337 mil toneladas (MPA, 2010).

A piscicultura de água doce no Brasil é dividida em dois setores: a produção de juvenis e o cultivo de peixes (Suplicy, 2007). É possível encontrar empresas com uma produção de peixes de pequena a grande escala em quase toda parte do país, embora o número exato de produtores seja difícil de determinar devido a um deficiente serviço de estatística neste setor. A escala de produção varia de 5 mil a mais de 50 milhões de juvenis por ano. Entretanto, a maioria das pisciculturas produz cerca de 500 mil a 10 milhões de juvenis por ano (Suplicy, 2007).

Na década de 1980, a indústria do comércio de juvenis foi fortemente focada para fornecer peixes a empreendimentos de lazer ou repovoamento de represas. A produção de juvenis para a piscicultura comercial visando o abastecimento de

restaurantes, supermercados e fábricas de processamento e filetagem só foram estabelecidos na década de 1990, o que trouxe consideráveis mudanças na demanda do consumidor. Há uma grande procura por espécies mais adequadas com estes propósitos, o que causam melhorias na piscicultura nacional, principalmente através de investimentos que surgem no setor (Suplicy, 2007). Consequentemente, no Brasil há uma crescente exigência por peixes de melhor qualidade, o que mostra a necessidade que programas de melhoramento genético sejam colocados em prática urgentemente.

A partir dos anos 80, a utilização de metodologias genéticas passou a contribuir de maneira efetiva nos programas de criação de peixes. A maioria das linhagens de peixes geneticamente melhoradas que alcançam a indústria da aquicultura foram desenvolvidas através de métodos tradicionais de manipulação genética, que incluem seleção, hibridação e endogamia (Foresti, 2000; Hulata, 2001). A hibridação interespecífica constitui um dos métodos mais utilizados nas pisciculturas mundiais e brasileiras, cujos resultados, no entanto, são de interpretação difícil e detalhada (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

## **1.1 Programas de Hibridação Interespecífica**

### **1.1.1 Características gerais**

A hibridação consiste no cruzamento de indivíduos ou grupos geneticamente diferentes e pode envolver cruzamentos dentro de uma espécie ou cruzamentos entre espécies separadas (hibridação interespecífica). Esta técnica de reprodução é usada para produzir organismos aquáticos com características desejáveis ou melhoramento geral de seus desempenhos na aquicultura (Bartley *et al.*, 2001).

Em peixes, a hibridação é um fenômeno bastante comum (Schwartz, 1981; Allendorf *et al.*, 2001), se comparado aos diversos grupos de vertebrados (Campton, 1987; Allendorf e Waples, 1996). Isto ocorre pelas características peculiares do grupo, entre elas a fertilização externa, mecanismos de isolamento, competição por territórios de desova, abundância de espécies e sobrevivência em ambientes limitados (Campton, 1987). Além do mais, metade dos eventos de hibridação em peixes tem sido atribuída à intervenção humana, com as atividades de aquicultura sendo o principal fator, seguidas de introduções de espécies fora do seu local de origem e alterações de hábitat, como observado por Scribner *et al.* (2001).

Bartley *et al.* (2001) revisaram uma ampla aplicação da produção artificial de híbridos interespecíficos em aquiculturas. Os programas de hibridação são utilizados em inúmeras espécies de peixes a fim de produzir animais estéreis e que possuam melhor desempenho que as espécies parentais (vigor híbrido), como o aumento da taxa de crescimento, melhor qualidade da carne, resistência a doenças e capacidade de tolerar variações ambientais, além do aperfeiçoamento de diversas outras características a fim de produzir peixes mais proveitosos para o cultivo.

Semelhante a outros ramos da agricultura, o uso de espécies híbridas tem desempenhado um papel importante na produção aquícola. Números consideráveis de híbridos são utilizados em vários países (FAO, 2010). Do total de 1,1 milhões de toneladas da produção da China reportada como Tilápia do Nilo, cerca de um quarto é um híbrido entre a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e Tilápia Azul (*O. aureus*). A Tailândia produz cerca de 136 mil toneladas de bagres híbridos (entre *Clarias gariepinus* e *C. macrocephalus*), que corresponde a 9,9% da produção total da aquicultura do país. Uma parte significativa das 324 mil toneladas de *snakehead* produzidos na China em 2008 foi do híbrido entre *Channa argus* e *C. maculata*, que

é relatada a aceitar rações formuladas mais facilmente em cultivo. O híbrido de *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum* é cultivado no Brasil com níveis de produção superior a 10 mil toneladas nos últimos anos. Os Estados Unidos da América tem cultivado o híbrido entre *Morone chrysops* x *M. saxatilis* há duas décadas e sua produção foi de cerca de 5 mil toneladas no período 2000-2008.

### **1.1.2 Considerações sobre os principais híbridos Neotropicais e suas espécies parentais**

Atualmente, a produção de híbridos de peixes envolve várias espécies Neotropicais, com produtos viáveis e de grande interesse para os produtores (Porto-Foresti *et al.*, 2010). Os resultados têm propiciado um desenvolvimento essencial para a piscicultura brasileira e fornecem produtos manipulados geneticamente de relevante valor comercial, com boa aceitação no mercado consumidor.

#### **+ Híbridos entre *Leporinus macrocephalus* e *L. elongatus***

A família Anostomidae (Teleostei, Characiformes) compreende um grupo de 12 gêneros e apresenta distribuição do sul da América Central até regiões tropicais e sub-temperadas da América do Sul (Garavello e Britski, 2003). O gênero *Leporinus* destaca-se pela presença de algumas espécies com grande valor econômico, tais como o Piaçu, *Leporinus macrocephalus*; a Piapara, *L. elongatus*; o Piau, *L. friderici* e a Piava, *L. obtusidens* (Reynalte-Tataje e Zaniboni-Filho, 2010).

Em geral, espécies de *Leporinus* possuem grande aceitação no mercado, pois são muito apreciadas pelos pescadores comerciais e esportivos por apresentarem excelente qualidade de carne e comportamento agressivo quando capturados em anzol (Reynalte-Tataje e Zaniboni-Filho, 2010).

Em termos de hibridação interespecífica, os cruzamentos entre estas espécies podem gerar o produto híbrido “Piaupara”, resultante do cruzamento da fêmea de *L. macrocephalus* e macho de *L. elongatus* (Porto-Foresti *et al.*, 2010), e comercializada em algumas pisciculturas do Estado de SP. Para estes híbridos ainda não há estudos descritos na literatura informando sobre suas possíveis vantagens e/ou desvantagens em relação aos parentais. Porém, devido aos potenciais riscos que podem representar ao meio ambiente, demonstram a necessidade da aquisição de informações e estabelecimento de estratégias para caracterização e monitoramento genético envolvendo estes híbridos.

#### **+ Híbridos entre *Piaractus mesopotamicus*, *P. brachypomus* e *Colossoma macropomum***

De acordo com Jégu (2003), a subfamília Serrasalminae inclui 15 gêneros e 80 espécies, com uma distribuição estritamente na região Neotropical. Atualmente, este grupo é classificado em nível de família, denominado Serrasalmidae (Calcagnotto *et al.*, 2005; Mirande, 2010), e englobam os peixes conhecidos popularmente conhecidos como Pacus, Tambaqui e as famosas Piranhas. Com base em dados moleculares, os serrasalmídeos são compreendidos por três grupos principais: “Piranha”, “Myleus” e “Pacu” (Ortí *et al.*, 1996; Ortí *et al.*, 2008).

O clado “Pacu” inclui espécies herbívoras dos gêneros *Mylossoma*, *Colossoma* e *Piaractus*. As espécies deste clado são as mais importantes economicamente da família, pois são consideradas alimentos de alta qualidade na América do Sul. No Brasil, o cultivo de representantes deste grupo corresponde à maior parcela da produção de espécies nativas na aquicultura continental (IBAMA, 2007). O aproveitamento destas espécies pela piscicultura tem sido uma boa

alternativa para suprir a demanda do mercado e reduzir o impacto nos estoques das populações naturais provocados pelo alto nível de exploração.

Atualmente, é por meio da técnica de hibridação interespecífica que o cultivo deste grupo de peixes tem merecido grande destaque na piscicultura brasileira. Para a obtenção de híbridos, os principais cruzamentos interespecíficos envolvem as espécies *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e *P. brachypomus*, que podem gerar uma grande heterogeneidade de produtos. Estes são produzidos e comercializados em larga escala pelas pisciculturas brasileiras.

Dos híbridos envolvendo estas espécies, o que apresenta maior importância comercial é o “Tambacu”, resultado do cruzamento entre fêmea de *C. macropomum* e macho de *P. mesopotamicus*. Estes híbridos se popularizaram no Brasil por causa da combinação da robustez do Tambaqui com a resistência às baixas temperaturas do Pacu (Calcagnotto *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2010). A qualidade superior do “Tambacu” em relação aos seus progenitores, no aspecto do crescimento, foi comprovada por Melo e Pereira (1994). No ano de 2007, em termos de produção, atingiu mais de 10 mil toneladas, sendo que em alguns Estados foi mais produzido do que as espécies parentais puras (IBAMA, 2007).

Outro híbrido que merece evidência é a “Tambatinga” (fêmea de *C. macropomum* e macho de *P. brachypomus*), que consta na estatística pesqueira com uma das principais fontes de produção em 2007, sendo comercializado mais do que a espécie parental *P. brachypomus* (IBAMA, 2007). A viabilidade do cultivo deste híbrido em relação aos seus progenitores, em termos de crescimento e produtividade, foi demonstrada por Silva *et al.* (1986) e Pinheiro *et al.* (1991).

A “Patinga”, do cruzamento entre fêmea de *P. mesopotamicus* e macho de *P. brachypomus*, apesar de não fazer parte da estatística da produção brasileira em

2007 (IBAMA, 2007), tem sido uma boa alternativa de produto comercializado pelas pisciculturas brasileiras. Estes híbridos têm tido boa aceitação e se popularizado bastante entre os consumidores. Entretanto, ainda são carentes os estudos biológicos sobre este produto híbrido. Conforme informações pessoais de alguns piscicultores, estes híbridos são aceitos comercialmente devido à qualidade da carne, pois apresentam menos gordura do que os parentais e os outros híbridos.

Em relação aos híbridos recíprocos resultantes destes cruzamentos, “Paqui” (fêmea de *P. mesopotamicus* x macho de *C. macropomum*), “Pirambaqui” (fêmea de *P. brachypomus* x macho de *C. macropomum*) e “Pirapicu” (fêmea de *P. brachypomus* x macho de *P. mesopotamicus*), não há relatos sobre a produção ou comercialização destes animais em grande escala pelas pisciculturas brasileiras.

#### **+ Híbridos entre *Pseudoplatystoma corruscans*, *P. reticulatum*, *Leiarius marmoratus* e *Phractocephalus hemiliopterus***

A família Pimelodidae é considerada um dos grupos mais importantes taxonomicamente entre os Siluriformes Neotropicais, sendo atualmente formada por 29 gêneros e 93 espécies (Ferraris Jr., 2007). Dentro desta família, destacam-se espécies notáveis pelo seu grande porte, como as pertencentes aos gêneros *Brachyplatystoma* (piraíbas e douradas), *Pseudoplatystoma* (pintados e surubins) e *Phractocephalus* (pirarara) (Lundberg e Littmann, 2003).

Nos últimos anos, as espécies de *Pseudoplatystoma* têm sido modelos de vários estudos taxonômicos. Historicamente, apenas três espécies eram reconhecidas (Lundberg e Littmann, 2003), mas na última revisão com base em caracteres morfológicos foram propostas oito espécies para o gênero (Buitrago-Suárez e Burr, 2007), sendo que *P. fasciatum* foi dividido em cinco espécies (*P.*

*fasciatum*, *sensu stricto*; *P. punctifer*; *P. reticulatum*; *P. orinocoense*; *P. magdaleniatum*). Recentemente, Torrico *et al.* (2009) e Carvalho-Costa *et al.* (2011), com base em dados de genes nucleares e mitocondriais, forneceram evidências para sugerir o reconhecimento de apenas quatro espécies distintas neste gênero: *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. tigrinun* (*sensu lato*) e *P. fasciatum* (*sensu lato*).

A produção pesqueira e consequente oferta no mercado de representantes deste grupo de peixes vêm reduzindo a cada ano, indicando uma situação causada pelas altas taxas de exploração devido à pesca predatória (Araújo-Lima e Rufino, 2003). Neste sentido, o cultivo de pimelodídeos tem se destacado gradualmente e auxilia para suprir a demanda do mercado, de forma a diminuir o impacto nos estoques das populações naturais provocados pela pesca comercial. Entretanto, a única espécie que consta na estatística pesqueira é *P. corruscans*, cujo crescimento da produção foi de 94%, no período de 2006-2009 (IBAMA, 2007; MPA, 2010). Estes são comercializados em razão da qualidade de carne, porte avantajado, pesca esportiva e importância histórica na produção da pesca (Campos, 2010).

Atualmente, através da técnica de hibridação, estes peixes têm se destacado na produção aquícola das pisciculturas brasileiras. Os híbridos gerados pelos cruzamentos entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*, denominados popularmente de “Ponto-e-vírgula”, são os peixes mais produzidos pelos vários produtores de juvenis que trabalham com essas espécies (Campos, 2010). De acordo com a revisão de Crepaldi *et al.* (2006), os híbridos apresentam características de melhor desempenho de crescimento do que as espécies puras. Porém, há uma enorme carência de informações sobre o comércio e produção destes peixes.

Segundo Campos (2010), a dificuldade na produção de juvenis de Pintado restringe a oferta e encarece o preço. A fim de facilitar a produção de juvenis com as

características do Pintado, vários produtores têm experimentado cruzamentos intergêneros com outros siluriformes de hábitos alimentares menos carnívoros, que apresentam boa aceitação de rações. Dentre as principais espécies, são destaques *P. hemioliopus* e *L. marmoratus*. Estas são geralmente cruzadas com a Cachara (*P. reticulatum*), produzindo os híbridos “Cachapira” (fêmea de *P. reticulatum* x macho de *P. hemioliopus*) e o “Cachandiá” ou “Pintado-da-amazônia” (fêmea de *P. reticulatum* x macho de *L. marmoratus*).

Os produtos destes cruzamentos são animais menos vorazes que os juvenis de Pintado puro e os híbridos “Ponto-e-vírgula”, o que facilita o fornecimento de alimento nas fases iniciais e reduz o problema do canibalismo, os gargalos da produção de juvenis de Pintado (Campos, 2010). Até o momento, há poucos estudos sobre a viabilidade destes peixes em pisciculturas ou de dados estatísticos referente à produção, mas a comercialização destes híbridos vem crescendo rapidamente.

### **1.1.3 Riscos causados pela hibridação interespecífica**

Em estoques cultivados, a grande semelhança morfológica dos híbridos com os seus parentais podem causar misturas ocasionais e resultar na formação de plantéis de reprodutores com indivíduos híbridos, como relatados para espécies de tilápias e carpas (Mia *et al.*, 2005; Mair, 2007). Um dos grandes problemas do uso da hibridação em escala comercial é o risco da contaminação dos estoques parentais puros através da introgressão pelos híbridos, o que prejudica a integridade destes estoques e consequente desempenho na aquicultura (Mair, 2007).

Já em relação aos estoques selvagens, os impactos genéticos dos híbridos tornam-se bem mais difíceis de serem previstos. Os híbridos parcialmente férteis ou os que apresentam fertilidade total são os que oferecem maiores riscos às

populações selvagens, pois podem realizar introgressões provocando contaminação genética e, desta forma, até causar a extinção de um dos parentais (Allendorf e Leary, 1988; Rhymer e Simberloff, 1996).

Os efeitos nocivos da hibridação, principalmente devido à introgressão, têm causado a extinção de muitas populações e espécies de plantas e animais (Allendorf *et al.*, 2001). Há exemplos bem documentados mostrando que introduções de peixes de água doce não-nativas, especialmente os híbridos, podem ter sérias consequências ecológicas (Rhymer e Simberloff, 1996; Vitule *et al.*, 2009), além do que ações de manejo na tentativa de recuperação são muito difíceis em certas situações (Genovart, 2009; Britton *et al.*, 2010).

De acordo com Hulata (1995), a esterilidade de híbridos pode ser uma qualidade importante em programas que visam reduzir os impactos em estoques naturais em casos de escapes da aquicultura. Entretanto, apesar de híbridos estéreis serem incapazes de retrocruzar com os parentais, podem competir por espaço e alimento. Ao mesmo tempo, híbridos com esterilidade zigótica apresentam desenvolvimento gonadal parcial e características sexuais secundárias, de forma que podem ocorrer cruzamentos mal sucedidos com as espécies parentais, não redundando em descendência viável, o que pode interferir negativamente na dinâmica reprodutiva das espécies parentais (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

No Brasil, há poucos estudos sobre a avaliação dos reais impactos genético-ecológicos que esses animais apresentam para as populações selvagens e cultivadas (Porto-Foresti *et al.*, 2010). Entretanto, alguns híbridos Neotropicais, como no caso do “Tambacu” e “Cachapinta”, podem apresentar certa taxa de fertilidade e retrocruzar com as espécies parentais (Almeida-Toledo *et al.*, 1996; J.A. Senhorini,

comunicação pessoal), o que revela a eminente possibilidade de atuação destes animais no meio ambiente e nas comunidades selvagens (Porto-Foresti *et al.*, 2010).

Além disso, de uma forma alarmante, é possível constatar que a produção e comercialização de híbridos já se tornaram prática de larga escala nas pisciculturas brasileiras, porém, sem qualquer tipo de monitoramento. Ao comprarem espécies puras os consumidores podem estar adquirindo exemplares híbridos de forma não discriminada, o que no futuro poderá acarretar em sérios danos e prejuízos para seus empreendimentos (Porto-Foresti *et al.*, 2010).

Esta preocupação ainda aumenta quando se leva em consideração os escapes de indivíduos híbridos que ocorrem em pisciculturas, que pode ser considerado um dos principais meios de dispersão de espécies exóticas (Welcomme, 1988; Agostinho e Julio, 1996). Os empreendimentos de lazer “pesque-pague” também representam significantes riscos, pois os escapes são considerados inevitáveis, principalmente devido ao despreparo dos proprietários em relação à conservação ambiental (Fernandes *et al.*, 2003). Os escapes com a água efluente, o esvaziamento dos tanques durante o manejo e, principalmente, o rompimento ou transbordamento desses em razão de picos de cheias, são as principais vias de introdução de espécies exóticas pelas atividades de cultivo (Orsi e Agostinho, 1999).

## **1.2 Métodos na detecção de hibridação**

Para um monitoramento genético de híbridos, tendo em vista os notáveis riscos biológicos que representam para as populações selvagens e cultivadas, é de grande importância a utilização de metodologias que identifiquem, de maneira clara e acessível, parentais e híbridos (Porto-Foresti *et al.*, 2010). Com o conhecimento do

perfil genético desses animais, em associação com práticas corretas de manejo, os problemas decorrentes do uso de animais geneticamente manipulados em cultivo poderiam ser minimizados e até evitados. Assim, seria possível o almejado desenvolvimento sustentável, utilizando recursos para melhorar a produção aquícola sem comprometer as futuras gerações, protegendo a biodiversidade nativa.

Em uma revisão sobre os métodos aplicados para identificar eventos de hibridação em peixes, Scribner *et al.* (2001) relataram que a maioria dos estudos utiliza os métodos morfológicos (45%), seguidos de aloenzimas (35%), DNA mitocondrial (12%), DNA nuclear (4%) e cariótipos (2%). Contudo, através da morfologia externa, nem sempre é precisa a identificação de parentais e híbridos (Mallet, 2005). As características morfométricas e merísticas em peixes, mesmo as que se mostram intermediárias nos híbridos, são de uso limitado porque geralmente apresentam herança poligênica e sua distribuição pode superar a dos parentais (Campton, 1987; Toledo-Filho *et al.*, 1994). Quando se utilizam somente métodos morfológicos na identificação de híbridos de peixes, pode ocorrer uma subestimativa da frequência dos híbridos, como no caso de híbridos entre *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum* (Toledo-Filho *et al.*, 1994), especialmente quando são analisados exemplares juvenis.

Consequentemente, a maior dificuldade para o monitoramento de híbridos de peixes é identificá-los usando informações taxonômicas tradicionais. Tal situação é agravada devido à indústria do comércio de juvenis nas pisciculturas brasileiras, cuja identificação morfológica é impraticável. Para colocar ações relacionadas à conservação e manejo dos híbridos em prática, há uma necessidade urgente para minimizar esses problemas. Assim, a produção generalizada de híbridos justifica o estabelecimento de marcadores genéticos na caracterização destes animais, o que

possibilita realizar o monitoramento em nível de populações selvagens, estoques de reprodutores, produção e comércio de juvenis.

### **1.2.1 Estudos citogenéticos na identificação de híbridos**

Os métodos citogenéticos, além de serem considerados de baixo custo, constituem uma maneira bastante precisa de se verificar tanto os níveis de ploidia quanto a procedência dos complementos cromossômicos dos parentais nos produtos híbridos (Ocalewicz *et al.*, 2006).

Nos casos em que híbridos e parentais apresentam o mesmo cariótipo, torna-se necessário o emprego de técnicas de colorações diferenciadas e bandamentos cromossômicos na tentativa de encontrar um marcador que os diferencie. Tais recursos metodológicos permitiram a perfeita identificação dos parentais e dos híbridos obtidos dos cruzamentos entre Pacu e Tambaqui (Almeida-Toledo *et al.*, 1987). Além disso, um híbrido triplóide proveniente destes mesmos cruzamentos também foi detectado, com um cariótipo de 81 cromossomos ( $3n$ ).

Outros estudos similares com a identificação de híbridos por bandamentos cromossômicos também foram realizados, tais como os híbridos entre espécies de carpas (Almeida-Toledo *et al.*, 1995) e entre espécies de bagres (Zhang e Tiersch, 1997). Recentemente, estudos citogenéticos também foram feitos na caracterização das espécies *Leporinus macrocephalus* (Piauçu), *L. elongatus* (Piapara) e o respectivo híbrido interespecífico “Piapara” (Hashimoto *et al.*, 2009a e 2009b).

### **1.2.2 Estudos moleculares na identificação de híbridos**

Atualmente, todos os métodos moleculares desenvolvidos para detectar variação genética são com base em três diferentes classes de marcadores:

variantes de proteínas, polimorfismo da sequência de DNA e variação em repetições de DNA (Schlötterer, 2004).

O interesse na caracterização e identificação de híbridos em pisciculturas e também estudos envolvendo hibridações naturais têm disponibilizado uma gama considerável de marcadores moleculares. Entre os mais utilizados estão do tipo isoenzimas (Calcagnotto *et al.*, 1999), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Perez *et al.*, 1999), SPAR (*Single Primer Amplification Reaction*) (Fonteles *et al.*, 2005), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Young *et al.*, 2001) e Microssatélites (Sanz *et al.*, 2009).

Em relação ao método de RFLP, a maioria das análises substitui o método “Southern blot” com as técnicas fundamentadas na reação de PCR (PCR-RFLP). Após a amplificação de uma região conhecida, os produtos de PCR são digeridos com enzimas de restrição e visualizados por simples eletroforese. Este marcador permite a análise de variação do DNA porque as substituições de bases nos sítios de reconhecimento de uma enzima alteram os padrões de fragmentos de restrição resultantes (Schlötterer, 2004). A técnica PCR-RFLP tem sido utilizada com sucesso na identificação de espécies de peixes (Wolf *et al.*, 2000; Mendonça *et al.*, 2009).

Outro método muito eficaz e rápido, porém pouco utilizado na caracterização de híbridos, é a técnica PCR-Multiplex. Este método consiste em utilizar primers espécie-específicos para um determinado *locus*, que difere de poucas substituições nucleotídicas para as espécies a serem analisadas, de tal forma que análises podem ser realizadas simultaneamente no mesmo tubo (Henegariu *et al.*, 1997; Markoulatos *et al.*, 2002). Esta técnica também tem se demonstrado resolutiva na diferenciação de espécies de peixes (Chapman *et al.*, 2003; De-Franco *et al.*, 2010).

### 1.3 Objetivos

Considerando que os estudos genéticos sobre híbridos interespecíficos de pisciculturas brasileiras ainda são escassos e verificados a importância do monitoramento genético da produção e comércio de híbridos nas estações de cultivo, o presente projeto tem como objetivos principais:

- 1)** desenvolver e estabelecer marcadores moleculares para a caracterização de híbridos interespecíficos F1 e pós-F1, resultantes de cruzamentos artificiais envolvendo espécies de peixes Neotropicais e que são atualmente produzidos nas pisciculturas brasileiras; disponibilizar recursos genéticos para serem aplicados de forma rotineira e com baixo custo na fiscalização dos programas de hibridação interespecífica no Brasil;
- 2)** monitorar a produção e comercialização de híbridos em pisciculturas brasileiras e, desta forma, verificar se híbridos são manejados corretamente nas pisciculturas e ainda se existem eventuais “misturas” ou contaminação genética decorrente de introgressões entre estoques parentais e híbridos;
- 3)** promover o levantamento de dados biológicos de espécies e de produtos híbridos que representem informações importantes para a piscicultura, tanto para fins comerciais como para fins de pesquisa básica.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Amostras para a caracterização dos marcadores moleculares

Inicialmente, tendo em vista o interesse no desenvolvimento de marcadores genéticos para a identificação de híbridos interespecíficos, foram coletadas amostras de nove espécies de peixes Neotropicais utilizadas em pisciculturas brasileiras. Os indivíduos amostrados compreendiam espécies de Anostomidae, sendo o Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) e Piapara (*Leporinus elongatus*); espécies de Serrasalminidae, abrangendo o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*); e espécies de Pimelodidae, envolvendo a Cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), Pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*) e Jândia (*Leiarius marmoratus*). Posteriormente, com o intuito de caracterização e estabelecimento dos marcadores moleculares, foram utilizados os seguintes exemplares híbridos (Tabela 1): “Piaupara”, “Tambacu”, “Tambatinga”, “Patinga”, “Pintachara”, “Cachapinta”, “Pintadiá”, “Cachandiá”, “Pintapira” e “Cachapira”.

Os representantes de “Piaupara” e suas respectivas espécies parentais *Leporinus macrocephalus* e *Leporinus elongatus* foram coletados em estoques de cultivo provenientes da piscicultura Kabeya (Penápolis, SP) (Tabela 2). Já as amostras dos híbridos “Tambacu”, “Tambatinga” e “Patinga”, e os correspondentes parentais *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e *Piaractus brachypomus* foram coletados nos estoques provenientes da piscicultura do CEPTA/ICMBio (Pirassununga, SP) (Tabela 2). Da mesma forma, os exemplares

híbridos “Pintachara”, “Cachapinta”, “Pintadiá” e “Cachandiá”, e as espécies puras *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Leiarius marmoratus* também foram obtidas nos estoques do CEPTA/ICMBio. Os indivíduos híbridos “Cachapira” e o parental *Phractocephalus hemioliopterus* (Pirarara) foram amostrados na piscicultura do Projeto Pacu (Campo Grande, MS) (Tabela 2). Por fim, a amostragem híbrida “Pintapira” foi obtida da piscicultura Brumado (Mogi Mirim, SP) (Tabela 2).

**Tabela 1** - Espécies parentais e respectivos cruzamentos interespecíficos.

| GERAÇÃO PARENTAL                               |                                                   | Produto Híbrido |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|
| Parental Fêmea                                 | Parental Macho                                    |                 |
| Piauçu<br><i>Leporinus macrocephalus</i>       | Piapara<br><i>Leporinus elongatus</i>             | “Piaupara”      |
| Tambaqui<br><i>Colossoma macropomum</i>        | Pacu<br><i>Piaractus mesopotamicus</i>            | “Tambacu”       |
| Tambaqui<br><i>Colossoma macropomum</i>        | Pirapitinga<br><i>Piaractus brachypomus</i>       | “Tambatinga”    |
| Pacu<br><i>Piaractus mesopotamicus</i>         | Pirapitinga<br><i>Piaractus brachypomus</i>       | “Patinga”       |
| Pintado<br><i>Pseudoplatystoma corruscans</i>  | Cachara<br><i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>    | “Pintachara”    |
| Cachara<br><i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> | Pintado<br><i>Pseudoplatystoma corruscans</i>     | “Cachapinta”    |
| Pintado<br><i>Pseudoplatystoma corruscans</i>  | Jandiá<br><i>Leiarius marmoratus</i>              | “Pintadiá”      |
| Cachara<br><i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> | Jandiá<br><i>Leiarius marmoratus</i>              | “Cachandiá”     |
| Pintado<br><i>Pseudoplatystoma corruscans</i>  | Pirarara<br><i>Phractocephalus hemioliopterus</i> | “Pintapira”     |
| Cachara<br><i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> | Pirarara<br><i>Phractocephalus hemioliopterus</i> | “Cachapira”     |

**Tabela 2** - Propriedade, linhagens de peixes e número de exemplares analisados dos parentais e híbridos utilizados nos programas de hibridação.

| Locais de Coleta                         | Linhagens                                       | Amostras |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------|
| Piscicultura Kabeya<br>(Penápolis, SP)   | Piauçu - <i>Leporinus macrocephalus</i>         | 49       |
|                                          | Piapara - <i>Leporinus elongatus</i>            | 50       |
|                                          | “Piaupara”                                      | 51       |
| CEPTA/ICMBio<br>(Pirassununga, SP)       | Tambaqui – <i>Colossoma macropomum</i>          | 41       |
|                                          | Pacu – <i>Piaractus mesopotamicus</i>           | 52       |
|                                          | Pirapitinga – <i>Piaractus brachypomus</i>      | 43       |
|                                          | “Tambacu”                                       | 15       |
|                                          | “Tambatinga”                                    | 22       |
|                                          | “Patinga”                                       | 25       |
|                                          | Pintado - <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>    | 20       |
|                                          | Cachara - <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>   | 20       |
|                                          | Jandiá – <i>Leiarius marmoratus</i>             | 15       |
|                                          | “Pintachara”                                    | 30       |
|                                          | “Cachapinta”                                    | 30       |
|                                          | “Pintadiá”                                      | 15       |
|                                          | “Cachandiá”                                     | 20       |
| Projeto Pacu<br>(Campo Grande, MS)       | Pirarara - <i>Phractocephalus hemiliopterus</i> | 25       |
|                                          | “Cachapira”                                     | 25       |
| Piscicultura Brumado<br>(Mogi Mirim, SP) | “Pintapira”                                     | 25       |

A piscicultura Kabeya (Figura 1), situada na região de Penápolis, SP, possui completa infra-estrutura para comercialização de peixes. O interesse desta empresa estava inicialmente voltado à engorda de peixes, mas se deparou com um mercado escasso na produção de juvenis. Por mais de dez anos dedica-se à criação e comercialização de juvenis de diversas espécies Neotropicais.



**Figura 1** - Piscicultura Kabeya  
(Penápolis, SP).

A piscicultura do CEPTA/ICMBio corresponde a um Centro de Pesquisa vinculado ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Figura 2). Sua principal missão é de contribuir para o uso sustentável dos recursos ictios, através da geração, adaptação e difusão de conhecimentos em benefício da sociedade. Para viabilizar seus objetivos, este Centro tem parcerias com instituições nacionais e internacionais, universidades e com a iniciativa privada.



**Figura 2** - Piscicultura do CEPTA/ICMBio (Pirassununga, SP).

O Projeto Pacu (Figura 3) é uma empresa privada e vem se dedicando há vários anos na pesquisa e desenvolvimento de tecnologia voltada à reprodução de peixes de grande porte, nativas do Pantanal e da Amazônia. Por deter a liderança de tecnologias reprodutivas de espécies que ainda não estão no mercado, esta empresa atualmente mantém acordos de cooperação tecnológicos com universidades e centros de pesquisa no Brasil, cedendo material e conhecimento.



**Figura 3** - Instalações do Projeto Pacu (Campo Grande, MS).

A Estação de Piscicultura Brumado, localizada na cidade de Mogi Mirim (SP) (Figura 4), é uma empresa privada que implantou em quase 20 anos de atividades um projeto sério e consistente de reprodução e alevinagem de peixes Neotropicais, com reservatórios, viveiros e laboratórios de reprodução. A Brumado Alevinos tornou-se um ambiente ideal para a pesquisa e o desenvolvimento, mantendo convênio de cooperação e aperfeiçoamento com centros de pesquisa e universidades.



**Figura 4** - Instalações da Piscicultura Brumado (Mogi Mirim, SP).

Em relação à coleta de material biológico das espécies parentais, fragmentos de nadadeira foram coletados para extração e purificação do DNA. A maioria dos animais foi devolvida aos tanques para serem mantidos vivos nas pisciculturas, enquanto alguns foram transportados para o laboratório. Procurou-se utilizar animais que fossem provenientes da natureza e não decorrentes de gerações sucessivas ( $F_1$ ,  $F_2$ ,...), resultantes de programas de reprodução induzida, o que evitou a possibilidade de contaminação genética das amostras. Alguns indivíduos foram marcados com *tags* (marcadores magnéticos) e sempre que necessário, estes podem ser identificados com um equipamento leitor.

Em uma segunda etapa de coleta, a partir de cruzamentos interespecíficos artificiais realizados na Piscicultura Kabeya, CEPTA/ICMBio, Projeto Pacu e Piscicultura Brumado, deu-se início ao processo de hibridação entre as espécies envolvidas neste estudo. Assim, no que se refere à coleta de material biológico dos produtos híbridos, as amostras foram obtidas principalmente de exemplares juvenis oriundos destes cruzamentos, que foram transportados ao laboratório para processamento do material. A seguir, os peixes foram numerados e registrados em caderno de campo. Por fim, os animais utilizados nos estudos genéticos foram

fixados em formol 10%, conservados em etanol 70%, e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética de Peixes da UNESP, Campus de Bauru, SP.

### **2.1.2 Amostras compradas de pisciculturas para a identificação molecular**

Compras de juvenis com tamanhos variando de 2 a 18 cm foram feitas em oito pisciculturas particulares (Tabela 3 e Figuras 5, 6 e 7). Como padronização, evitou-se a compra de juvenis de locais considerados revendedores, ou seja, só foram adquiridos peixes de pisciculturas que realizam reprodução e alevinagem. Para manter a integridade destas pisciculturas, uma vez que o objetivo do estudo é o monitoramento da produção e comércio de híbridos, e não uma análise forense, os nomes e informações das pisciculturas foram preservados.

Na piscicultura A (SP), foram comprados exemplares de *Leporinus macrocephalus*, *Pseudoplatystoma corruscans*, híbridos “Patinga” e “Tambacu”. Na piscicultura B (SP), foram adquiridos indivíduos rotulados como *Colossoma macropomum* e híbridos de “Patinga”, “Tambacu” e “Cachapira”. Na piscicultura C (MS), foram comprados juvenis de *L. macrocephalus*, *Pseudoplatystoma corruscans* e híbrido “Tambacu”. Na piscicultura D (MG), foram comercializados exemplares de *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus*, *Leporinus macrocephalus* e “Tambacu”. Na piscicultura E (SP), foram comprados juvenis de “Patinga” e *Leporinus macrocephalus*. Na piscicultura F (SE), foram adquiridos indivíduos de *Colossoma macropomum*, híbridos “Tambacu”, “Tambatinga” e “Cachandiá”. Na piscicultura G (GO), foram comprados juvenis de “Cachandiá”. Por fim, na piscicultura H (SP), foram adquiridos exemplares juvenis de *Pseudoplatystoma corruscans*.

**Tabela 3** - Propriedades, linhagens de peixes, preço por juvenil, tamanho e número de exemplares analisados das espécies parentais e híbridos.

| Locais de Coleta       | Linhagens                                    | Amostras | Preço (R\$)/<br>unidade | Tamanho<br>(cm) |
|------------------------|----------------------------------------------|----------|-------------------------|-----------------|
| Piscicultura A<br>(SP) | Piauçu - <i>Leporinus macrocephalus</i>      | 30       | 0,45                    | 8-10            |
|                        | Pintado - <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> | 20       | 5,50                    | 12-15           |
|                        | “Patinga”                                    | 33       | 1,30                    | 8-10            |
|                        | “Tambacu”                                    | 50       | 1,30                    | 8-10            |
| Piscicultura B<br>(SP) | Tambaqui – <i>Colossoma macropomum</i>       | 36       | 0,18                    | 2-3             |
|                        | “Tambacu”                                    | 44       | 0,30                    | 8-10            |
|                        | “Patinga”                                    | 49       | 0,50                    | 8-10            |
|                        | “Cachapira”                                  | 37       | 2,50                    | 10-12           |
| Piscicultura C<br>(MS) | Piauçu - <i>Leporinus macrocephalus</i>      | 158      | 0,40                    | 8-10            |
|                        | Pintado - <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> | 50       | 2,50                    | 13-15           |
|                        | “Tambacu”                                    | 158      | 0,30                    | 3-5             |
| Piscicultura D<br>(MG) | Tambaqui – <i>Colossoma macropomum</i>       | 143      | 0,20                    | 3-5             |
|                        | Pacu – <i>Piaractus mesopotamicus</i>        | 115      | 0,20                    | 3-5             |
|                        | Piauçu - <i>Leporinus macrocephalus</i>      | 100      | 0,20                    | 3-5             |
|                        | “Tambacu”                                    | 133      | 0,20                    | 3-5             |
| Piscicultura E<br>(SP) | Piauçu - <i>Leporinus macrocephalus</i>      | 100      | 0,30                    | 4-6             |
|                        | “Patinga”                                    | 44       | 0,30                    | 6-9             |
| Piscicultura F<br>(SE) | Tambaqui – <i>Colossoma macropomum</i>       | 150      | 0,10                    | 2-3             |
|                        | “Tambacu”                                    | 150      | 0,10                    | 2-3             |
|                        | “Tambatinga”                                 | 150      | 0,10                    | 2-3             |
|                        | “Cachandiá”                                  | 41       | 4,00                    | 8-12            |
| Piscicultura G<br>(GO) | “Cachandiá”                                  | 60       | 4,50                    | 15-18           |
| Piscicultura H<br>(SP) | Pintado - <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> | 20       | 3,00                    | 13-15           |

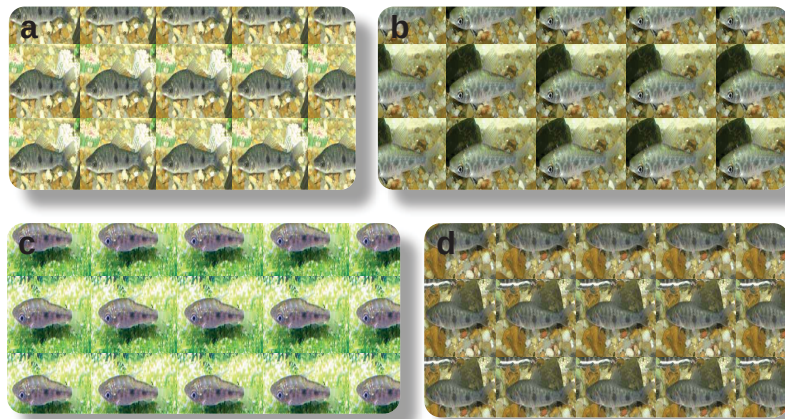


**Figura 5** - Exemplares comprados como Piauçu dos lotes de juvenis da Piscicultura A (a), Piscicultura C (b), Piscicultura D (c) e Piscicultura E (d).

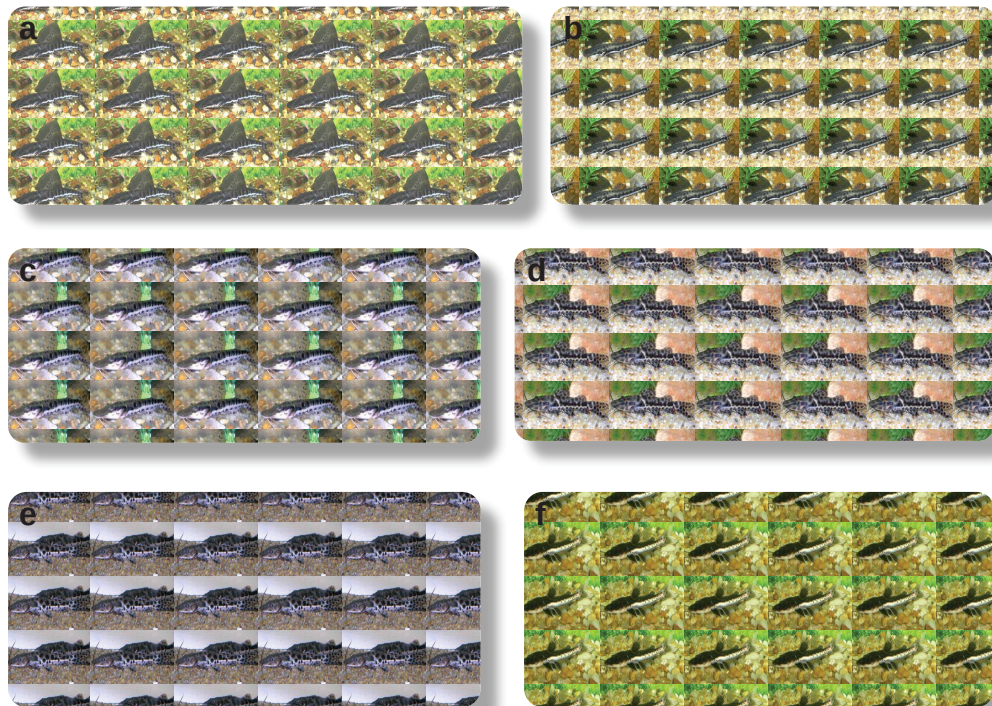


**Figura 6** - Exemplares comprados como Pintado dos lotes de juvenis da Piscicultura A (a), Piscicultura C (b) e Piscicultura H (c). Em (d) e (e), exemplares adquiridos como “Cachandiá” dos estoques de juvenis da Piscicultura F e Piscicultura G, respectivamente. Em (f), indivíduo comercializado como “Cachapira” do lote de juvenis da Piscicultura B.

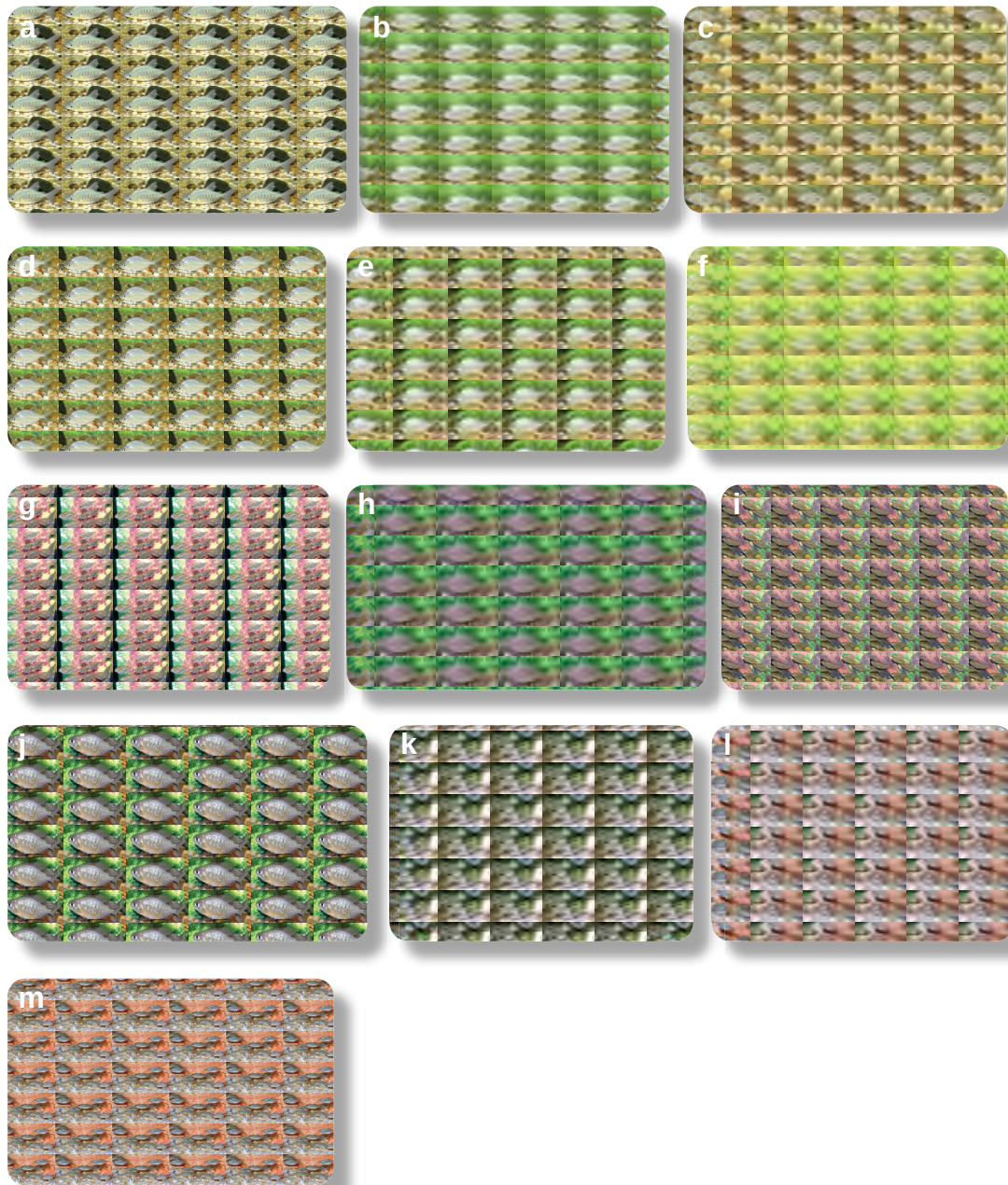


**Figura 7** – Em (a) e (b), exemplares comercializados como “Patinga” e “Tambacu”, respectivamente, dos lotes de juvenis da Piscicultura A. Em (c), (d) e (e), indivíduos comprados como *Colossoma macropomum*, “Tambacu” e “Patinga”, respectivamente, dos estoques da Piscicultura B. Em (f) juvenil adquirido como “Tambacu” da Piscicultura C. Em (g), (h) e (i), exemplares comprados como *C. macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e “Tambacu”, respectivamente, dos lotes da Piscicultura D. Em (j), juvenil coletado como “Patinga” da Piscicultura E. Em (k), (l) e (m), indivíduos comprados como *C. macropomum*, “Tambacu” e “Tambatinga”, respectivamente, da Piscicultura F.

No momento da compra, os piscicultores não foram notificados que se tratavam de coletas para fins de análise científica. Assim, os juvenis de peixes foram comprados com fins particulares para uso em uma pequena propriedade rural, o que possibilitou ter uma padronização com relação à amostragem dos peixes, e evitando possíveis desconfiâncias dos piscicultores no momento da comercialização.

Alguns indivíduos foram mantidos vivos em fazendas particulares para acompanhamento do crescimento. Após a coleta do material biológico (amostras de nadadeira e sangue), os juvenis foram fixados e depositados na coleção de peixes Laboratório de Genética de Peixes, alocado na Universidade Estadual Paulista, campus Bauru. Foram realizadas técnicas de extração e purificação de DNA, formando um banco de moléculas para um posterior processamento das análises. Adicionalmente, visando uma análise citogenética, foram realizadas técnicas de obtenção de cromossomos mitóticos nas amostras de “Patinga” da Piscicultura **A**.

### **2.1.3 Amostras de um estoque de reprodutores**

Na última etapa de coleta do material, com o objetivo de realizar um serviço de consultoria para uma importante piscicultura do Estado de SP, amostras biológicas (fragmentos de nadadeira) de um plantel de 16 matrizes de Pintado, Cachara e híbridos foram coletadas para análises de identificação molecular (Figura 8). As análises foram realizadas devido a suspeita das matrizes serem compostas por produtos híbridos, uma vez que o produtor tem relatado problemas de alta taxa de mortalidade e pouca viabilidade dos juvenis. Os animais foram marcados com *tags* (marcadores magnéticos) e mantidos vivos nas instalações da piscicultura, possibilitando que seja realizado um serviço de direcionamento e orientação dos cruzamentos que o piscicultor deve realizar.

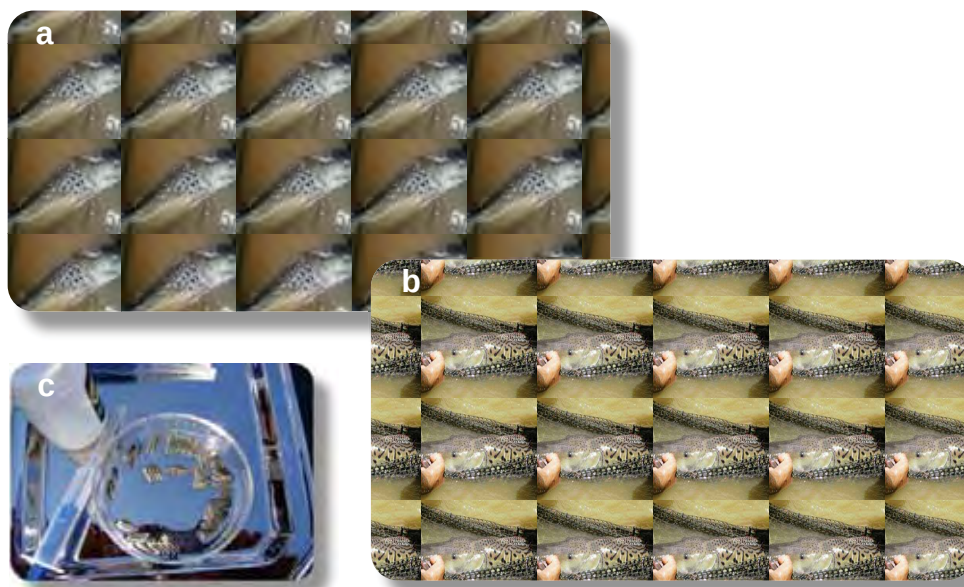


**Figura 8** – Em (a) e (b), exemplares adultos do plantel de matrizes coletados de uma piscicultura particular para realização de consultoria. Em (c), tags e seringa injetora para marcação destes indivíduos.

## 2.2 Métodos

### + Métodos para as análises citogenéticas

Nas análises citogenéticas foram utilizados os métodos de estimulação de mitoses (Oliveira *et al.*, 1988), preparações diretas de células renais *in vivo* (Foresti *et al.*, 1981) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Yang *et al.*, 1999). Algumas modificações foram realizadas nessas técnicas como padronização. Para montagem dos cariótipos, utilizou-se a classificação descrita por Levan *et al.* (1964).

#### 2.2.1 Estimulação de mitoses

Com o objetivo de se obter maior número de mitoses foi utilizada a técnica de estimulação de divisão celular por injeção de uma solução de fermento biológico, adaptada para peixes por Oliveira *et al.* (1988). O procedimento consistiu em:

- 1** preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção:  
0.5 g de fermento, 0.5 g de açúcar e 7 ml de água destilada;
- 2** incubar a solução em uma estufa (37°C) por cerca de 30 min;
- 3** injetar a solução na região dorso-lateral do peixe, na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal, 48 h antes da técnica de preparação cromossômica;
- 4** manter o animal em aquário bem aerado.

### **2.2.2 Obtenção de cromossomos mitóticos de peixes**

A técnica para obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos foi a utilizada por Foresti *et al.* (1981), realizada com algumas modificações:

- 1** injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0.025%) na proporção de aproximadamente 0.5 ml por 100 g de peso do animal;
- 2** deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 min;
- 3** sacrificar o animal, retirando a parte anterior do rim. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 7 ml de uma solução hipotônica de KCL (0.075M);
- 4** dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur;
- 5** transferir a solução obtida para um tubo de centrífuga e manter em uma estufa a 37°C por 21 min;
- 6** retirar o tubo da estufa e colocar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 7** adicionar cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (900 ± 100 rpm) por 10 min;

- 8** retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 7 ml de fixador; centrifugar por 7 min a  $900 \pm 100$  rpm;
- 9** repetir o item 8 por duas ou três vezes, para uma completa fixação das células;
- 10** pingar o material em lâminas e deixar secar ao ar;
- 11** as lâminas foram guardadas no congelador, conservando-as para aplicação das técnicas de FISH.

### **2.2.3 Obtenção de sondas específicas de DNA ribossomal 5S**

Para realização da técnica de hibridização fluorescente *in situ* foram utilizadas sequências de DNA ribossomal (DNAr) 5S como sonda (cerca de 300 pb), obtidas através da amplificação por PCR com os primers 5SA e 5SB (Pendás *et al.*, 1994). Amplificações foram feitas com um volume final de 25 µl contendo as seguintes concentrações: tampão da Taq polimerase 1X; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; 100 µM de cada dNTP; 0.1 µM de cada primer; 10-50 ng de DNA genômico; e 0.5 U de Taq polimerase (Invitrogen). As reações foram realizadas com as seguintes condições: 95°C/5 min; 95°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/15 s (35 ciclos); 72°C/7 min. A sonda foi marcada pela incorporação do nucleotídeo biotina-16-dUTP (Roche) através da técnica de *nick translation*, segundo as instruções do fabricante (Invitrogen).

### **2.2.4 Hibridação fluorescente *in situ***

- 1** incubar as lâminas em uma solução contendo 200 µl de 2XSSC (pH=7,0) e 2 µl de RNase (100 mg/ml) em uma câmara úmida a 37°C por 1 h;
- 2** lavar as lâminas duas vezes em 2XSSC por 2 min a temperatura ambiente;
- 3** desidratar as lâminas em séries de etanol a 70%, 85% e 100% a -20 °C por 3 min cada. Deixar as lâminas secando ao ar;

- 4** em um *coplin* de vidro preparar 40 ml de uma solução de desnaturação (70% Formamida, 2XSSC) e aquecer a 65°C em um banho-maria. Colocar as lâminas na solução de desnaturação e incubar por 2 min;
- 5** desidratar as lâminas em séries de etanol a 70%, 85% e 100% a -20 °C por 3 min cada. Deixar as lâminas secando ao ar;
- 6** misturar 6 µl da solução das sondas e 6 µl da solução de hibridação;
- 7** desnaturar as sondas no termociclador incubando a 75°C por 10 min;
- 8** colocar a solução da sonda desnaturada em cada lâmina e cobrir com lamínula. Selar as bordas da lamínula com cimento de borracha;
- 9** incubar as lâminas a 37°C por cerca de 15 h (*overnight*) em uma câmara úmida;
- 10** remover o cimento de borracha e as lamínulas. Lavar as lâminas duas vezes em uma solução de estringência (50% formamida/2XSSC) por 5 min a 45°C;
- 11** lavar as lâminas duas vezes em 2XSSC por 5 min a 45°C. Lavar as lâminas na solução 4XT (20% 20XSSC + 250 µl Triton X-100) por 4 min a 45°C;
- 12** remover as lâminas da solução 4XT. Aplicar em cada gota de suspensão celular o anticorpo (200 µl de 4XT + 1 µl de avidina conjugada com FITC) e cobrir com uma lamínula de plástico. Incubar as lâminas a 37°C por 30 min em uma câmara úmida;
- 13** remover as lamínulas. Lavar as lâminas três vezes na solução 4XT por 3 min;
- 14** Contra-corar com o corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories) e cobrir com lamínula.

### **2.2.5 Estudos cariotípicos**

A partir dos dados das análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases de cada indivíduo, procurou-se estabelecer um número diplóide modal para cada exemplar analisado.

Assim, as melhores metáfases, que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas pela câmera CCD (Cohu Inc., USA) montada em fotomicroscópio da marca OLYMPUS (modelo BX60), equipado com epi-fluorescência, com objetiva de imersão de 100X. As imagens de FISH foram capturadas e processadas pelo software CytoVision Genus system (Applied Imaging, USA).

### **2.2.6 Montagem dos cariótipos**

Os cromossomos foram recortados utilizando o programa Adobe Photoshop Elements versão 6.0 (Adobe System) para a montagem dos cariótipos, sendo classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), com base no trabalho de Levan *et al.* (1964). Por fim, foram dispostos em ordem decrescente de tamanho para a organização final do cariótipo. Os cromossomos não foram pareados, uma vez que são pertencentes de produtos híbridos, cujos cromossomos provindos de diferentes espécies não são homólogos.

### **+ Métodos para as análises moleculares**

Para as análises moleculares, foram utilizados os métodos de extração e purificação do DNA total baseados no kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Em seguida, foram amplificadas e sequenciadas regiões gênicas mitocondriais e nucleares de cinco exemplares de cada espécie parental. A partir do alinhamento das sequências pelo programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), encontraram-se alguns sítios polimórficos espécie-específicos para o uso das técnicas de PCR-RFLP e PCR-Multiplex. A primeira foi baseada em mapas de restrição gerados pelo programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003), enquanto na

segunda foram desenhados primers espécies-específicos com auxílio do programa NetPrimer. De acordo com as espécies e híbridos a serem identificados, foram utilizados os genes mitocondriais RNA Ribossomal 16S, Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) e Citocromo B (CYTB). Em relação ao genoma nuclear, foram utilizadas as regiões dos genes nucleares codificadores da  $\alpha$ -tropomiosina (TROP), Gene Ativador da Recombinação 2 (*Recombination Activating Gene 2* - RAG2), Fator de Elongação 1-alfa (EF1 $\alpha$ ),  $\beta$ -globina (GLOB) e RNA Ribossomal 18S.

### **2.2.7 Extração e purificação de DNA**

Para extração de DNA, foi utilizado o protocolo do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), com algumas modificações:

- 1** retirar um pequeno pedaço de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 min;
- 2** adicionar 300  $\mu$ l de “Nuclei Lysis Solution” ao tecido;
- 3** adicionar 2.5  $\mu$ l de Proteinase K (10 mg/ml);
- 4** colocar no banho-maria a 60° C por 1 h;
- 5** retirar do banho-maria e deixar voltar a temperatura ambiente;
- 6** adicionar 1.5  $\mu$ l de “RNase” e colocar no banho-maria a 37° C por 30 min;
- 7** retirar e deixar voltar a temperatura ambiente;
- 8** adicionar 200  $\mu$ l de “Protein Precipitation Solution” e misturar;
- 9** levar ao gelo por 5 min;
- 10** centrifugar por 4 min a 13.000 rpm;
- 11** transferir o sobrenadante para uma segunda série de tubo de microcentrífuga contendo 600  $\mu$ l de Isopropanol e misturar por inversão;
- 12** centrifugar por 4 min a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;

- 13** adicionar 600 µl de Etanol 70% e centrifugar por 4 min a 13.000 rpm;
- 14** descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente por 1 h;
- 15** adicionar 30 µl de “DNA Rehydration Solution” e deixar por 24 h a 4°C.

### 2.2.8 Amplificação dos fragmentos gênicos mitocondriais e nucleares

As condições da PCR padrão bem como a relação dos conjuntos de primers utilizados para amplificação de fragmentos gênicos mitocondriais e nucleares estão descritas nas Tabelas 4 e 5. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) com um volume final de 25 µl contendo as seguintes concentrações: tampão da Taq polimerase 1X; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; 100 µM de cada dNTP; 0.1 µM de cada primer universal; 10-50 ng de DNA genômico e 0.5 U de Taq polimerase (Invitrogen). Os produtos gerados pela PCR foram aplicados em um gel de agarose 1,0% para verificar o resultado da amplificação por PCR.

**Tabela 4** - Condições da PCR.

| Gene         |      | Desnaturação 95° C | Ciclos                              | Extensão 72° C |
|--------------|------|--------------------|-------------------------------------|----------------|
| Mitocondrial | 16S  | 5 min              | 30x 95°C/30 s, 52°C/45 s, 72°C/20 s | 7 min          |
|              | COI  | 5 min              | 30x 95°C/30 s, 58°C/45 s, 72°C/30 s | 7 min          |
|              | CYTB | 5 min              | 30x 95°C/30 s, 60°C/45 s, 72°C/30 s | 7 min          |
| Nuclear      | RAG2 | 5 min              | 35x 95°C/30 s, 52°C/30 s, 72°C/30 s | 7 min          |
|              | TROP | 5 min              | 35x 95°C/30 s, 60°C/30 s, 72°C/10 s | 7 min          |
|              | GLOB | 5 min              | 35x 95°C/45 s, 58°C/30 s, 72°C/30 s | 7 min          |
|              | EF1α | 5 min              | 35x 95°C/45 s, 56°C/30 s, 72°C/30 s | 7 min          |
|              | 18S  | 5 min              | 35x 95°C/30 s, 50°C/30 s, 72°C/10 s | 7 min          |

**Tabela 5** - Primers universais utilizados para amplificação de parte do gene mitocondrial e nuclear.

| Primer                                   | Sequência dos primers                                                     | Referência                   |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <i>16S F</i><br><i>16S R</i>             | 5'- ACGCCTGTTTATCAAAAACAT -3'<br>5'- CCGGTCTGAACTCAGATCACGT -3'           | Kocher <i>et al.</i> , 1989  |
| <i>COI F</i><br><i>COI R</i>             | 5'- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC -3'<br>5'- TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGGAATCA -3' | Ward <i>et al.</i> , 2005    |
| <i>CYTB SerraF</i><br><i>CYTB SerraR</i> | 5'- GAYATCTCYACAGCCTTCTCCTC -3'<br>5'- GCGTAGGCAAATAGGAAGTATC -3'         | Presente trabalho            |
| <i>Trop F</i><br><i>Trop R</i>           | 5'- GAGTTGGATCGGGCTCAGGAGCG -3'<br>5'- CGGTCAGCCTCTTCAGCAATGTGCTT -3'     | Friesen <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>RAG2 SerraF</i><br><i>RAG2 SerraR</i> | 5'- AGCTGCGTGCCATCTCATTCT -3'<br>5'-GTGGCTCTCGAGGTTCCATA-3'               | Presente trabalho            |
| <i>RAG2 SiluF</i><br><i>RAG2 SiluR</i>   | 5'- CCTGAGTGCTACCTTATTCATGGA -3'<br>5'- CTTGGGAGGAAGAGACCATC -3'          | Presente trabalho            |
| <i>GLOB IpF</i><br><i>GLOB IpR</i>       | 5'- CGTTCAGAACAGGTTTTGCT -3'<br>5'- TCAGGAACTTCTGCCAAGTC -3'              | Presente trabalho            |
| <i>GLOB SiluF</i><br><i>GLOB SiluR</i>   | 5'- TCAATATGGTTCACTGGACAGA -3'<br>5'- CCAAGAAGCTGAAAGTAGACAGT -3'         | Presente trabalho            |
| <i>EF1α F</i><br><i>EF1α R</i>           | 5'- ATTGGAAGTGTACCTGTGG -3'<br>5'- CAGCCTTCTGTGCAGACTT -3'                | Moyer <i>et al.</i> , 2004   |
| <i>18S NS1</i><br><i>18S NS8</i>         | 5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC -3'<br>5'- TCCGCAGGTTACCTACGGA -3'                | White <i>et al.</i> , 1990   |
| <i>18S SiluR</i>                         | 5'- CCATCGAAAAGTTGATAGGG -3'                                              | Presente trabalho            |

Os primers *CYTB SerraF* e *CYTB SerraR* foram desenhados usando como molde sequências da espécie *Piaractus brachypomus* (GenBank AY791429) e *Colossoma macropomum* (GenBank AY791386), enquanto que os primers *RAG2 SerraF* e *RAG2 SerraR* foram desenvolvidos com base em uma sequência de *P. mesopotamicus* (GenBank AY804118). Os primers *RAG2 SiluF* e *RAG2 SiluR* foram

desenhados utilizando como modelo uma sequência da espécie *Phractocephalus hemioliopus* (GenBank DQ492364).

Em relação aos primers da  $\beta$ -globina, inicialmente foram obtidas sequências para as espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. reticulatum* com os primers *GLOB IpF* e *GLOB IpR*, desenhados através de uma sequência da espécie *Ictalurus punctatus* (GenBank AY462104). Entretanto, para um melhor desempenho nas reações PCR-Multiplex e PCR-RFLP, com base nas sequências obtidas para as espécies de *Pseudoplatystoma*, foram desenhados os primers *GLOB SiluF* e *GLOB SiluR*. Da mesma forma, para o gene RNA Ribossomal 18S, foram inicialmente sequenciados produtos amplificados das espécies de *Pseudoplatystoma* pelos primers *18S NS1* e *18S NS8* (White *et al.*, 1990). Em seguida, a partir destas sequências foi desenhado o primer *18S SiluR*, para ser utilizado ao invés do primer *18S NS8*, com o intuito de obter melhores resultados nas reações de PCR-Multiplex e PCR-RFLP.

### 2.2.9 Sequenciamento das amostras

Após a amplificação dos fragmentos gênicos, os produtos de PCR foram purificados usando a enzima ExoSap-IT (USB Corporation), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os produtos amplificados e purificados foram utilizados como moldes para as reações de sequenciamento com o kit *Big Dye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), submetido ao programa no manual do kit. Após mais uma etapa de purificação com precipitação por acetato de sódio e EDTA, seguida de duas centrifugações de etanol 95% e 70%, respectivamente, as amostras foram aplicadas no sequenciador automático por capilaridade ABI3130 (Perking-Elmer). As sequências deste estudo foram obtidas com uma réplica, sendo consideradas satisfatórias apenas as que

apresentaram alta qualidade nos picos de eletroferograma. Posteriormente, as sequências serão depositadas no GenBank do National Center of Biotechnology Information (NCBI), vinculado ao National Institute of Health (NIH).

A divergência genética foi estimada utilizando o software MEGA (modelo Kimura 2-parâmetros), versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), e o número de sítios polimórficos foi calculado usando o software DnaSP (Rozas *et al.*, 2003).

#### **2.2.10 Análises de PCR-Multiplex**

As sequências foram alinhadas através do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), e otimizado manualmente no programa BIOEDIT (Hall, 1999), para verificar pontos de mutação em que foram desenhados os primers. Os primers espécie-específicos foram desenvolvidos de modo que permitissem gerar fragmentos de diferentes tamanhos e exclusivos para cada espécie parental. As condições ideais dos primers foram seguidas de acordo com modelos teóricos descritos por Rychlik *et al.* (1990) e Burpo (2001), e analisados através do programa NetPrimer, disponível no site <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>>.

Os primers espécie-específicos utilizados em PCR-Multiplex estão descritos na seção dos Resultados. Já as condições das reações foram mantidas de acordo com a Tabela 3, exceto em algumas situações em que foram necessárias modificações na temperatura de anelamento para maior especificidade das reações. Em relação às concentrações dos reagentes, quando necessário, foram alteradas de acordo com modelos descritos por Henegariu *et al.* (1997) e Markoulatos *et al.* (2002), visto que alguns *loci* apresentaram dificuldades de amplificação.

### **2.2.11 Análises de PCR-RFLP**

As regiões sequenciadas foram submetidas ao programa NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) para gerar mapas de restrição, tornando possível encontrar enzimas específicas capazes de gerar padrões de clivagem diagnósticos para as espécies parentais analisadas. Procurou-se utilizar enzimas com corte único na sequência, ou seja, foram evitadas as enzimas com mais de um ponto de clivagem, uma vez que nestes casos os padrões de bandamentos não ficaram evidentes em gel de agarose. Amplificações de PCR foram de acordo com o item **2.2.8**. Em seguida, os produtos gênicos amplificados foram submetidas à restrição enzimática numa reação com volume final de 6 µl contendo as seguintes concentrações: 3 µl de produto de PCR; tampão da enzima 1X e 5 U da enzima de interesse (New England Biolabs). O produto final foi incubado à temperatura apropriada de cada enzima durante 1 h.

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

### 3 RESULTADOS

Os resultados obtidos das análises genéticas encontram-se apresentados na forma de tópicos, referentes a cada grupo de espécies abordado neste estudo. Dentro de cada tópico, os resultados foram estruturados para primeiramente apresentar os dados de estabelecimento dos marcadores moleculares e, em seguida, foram demonstradas as análises de identificação molecular dos estoques. Para cada grupo estudado, foram desenvolvidos marcadores com base em genes mitocondriais e nucleares para a diferenciação das espécies, através de duas metodologias, PCR-RFLP e PCR-Multiplex.

Em relação às análises de identificação molecular dos estoques, os resultados foram inicialmente obtidos com os marcadores de PCR-Multiplex e, em seguida, uma amostragem dos indivíduos foi confirmada pela metodologia de PCR-RFLP, com algumas exceções que são discriminadas no momento apropriado.

Tendo em vista que um dos objetivos deste trabalho consistiu no desenvolvimento e estabelecimento de marcadores moleculares, a estratégia para obtenção de genes candidatos como subsídios para as técnicas de PCR-RFLP e PCR-Multiplex seguiu a seguinte sistemática:

- inicialmente, para todos os grupos as análises procederam-se com a amplificação do gene mitocondrial 16S, contudo, nos estudos preliminares das espécies de Serrasalmidae foi observado que entre as espécies de *Piaractus* as sequências não apresentavam divergência genética. Por isso, para as espécies deste grupo os marcadores foram estabelecidos com base nos genes mitocondriais Citocromo oxidase e Citocromo B.

- em relação aos genes nucleares, iniciaram-se os estudos através da amplificação de um fragmento do gene  $\alpha$ -tropomiosina, entretanto, este só mostrou eficiência para o estabelecimento de marcadores para as espécies de *Leporinus*. Para as espécies de Serrasalminidae, o gene  $\alpha$ -tropomiosina serviu como fonte para os marcadores de PCR-Multiplex, enquanto que para o método de PCR-RFLP tornou-se necessário a aquisição de um gene nuclear adicional. Na tentativa de estabelecer o gene  $\alpha$ -tropomiosina para diferenciação das espécies de Pimelodidae, os resultados de amplificações preliminares evidenciaram múltiplas bandas, o que impossibilitou a análise e demonstrou a necessidade de buscar outros genes nucleares. Desta maneira, foi utilizado para os grupos de Serrasalminidae e Pimelodidae o gene RAG2. Adicionalmente, para a diferenciação das espécies de *Pseudoplatystoma* foram desenvolvidos marcadores de PCR-Multiplex e PCR-RFLP com base dos genes nucleares codificadores do Fator de Elongação 1-alfa (EF1 $\alpha$ ),  $\beta$ -globina (GLOB), e RNA Ribossomal 18S.

### 3.1.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre *Leporinus elongatus* e *L. macrocephalus*

Para as espécies parentais *L. elongatus* e *L. macrocephalus* foram sequenciados os genes mitocondrial 16S e nuclear  $\alpha$ -tropomiosina (TROP). Os resultados obtidos pelo sequenciamento permitiram a análise de 512 pares de base (pb) do gene 16S (31 sítios polimórficos) e 282 pb do gene TROP (cinco sítios polimórficos), que foram associados com uma divergência genética de 0.064 e 0.018, respectivamente. Evidenciado por algumas diferenças de composição nucleotídica, os resultados demonstraram que estas sequências de DNA são suficientes para a distinção das duas espécies, permitindo tanto as análises de sítios de restrição enzimática quanto o desenho de primers espécie-específicos.

#### *PCR-RFLP*

A análise dos mapas de restrição possibilitou verificar algumas enzimas para produzir cortes espécie-específicos e serem utilizadas na diferenciação destas espécies. No entanto, neste estudo utilizou-se a enzima *AccI* para o gene mitocondrial 16S e a enzima *NsiI* para o gene nuclear TROP, ambos com digestão enzimática apenas nos fragmentos gênicos de *L. macrocephalus*. Os sítios de clivagem de cada enzima estão evidenciados nos mapas de restrição (Figuras 9 e 10).

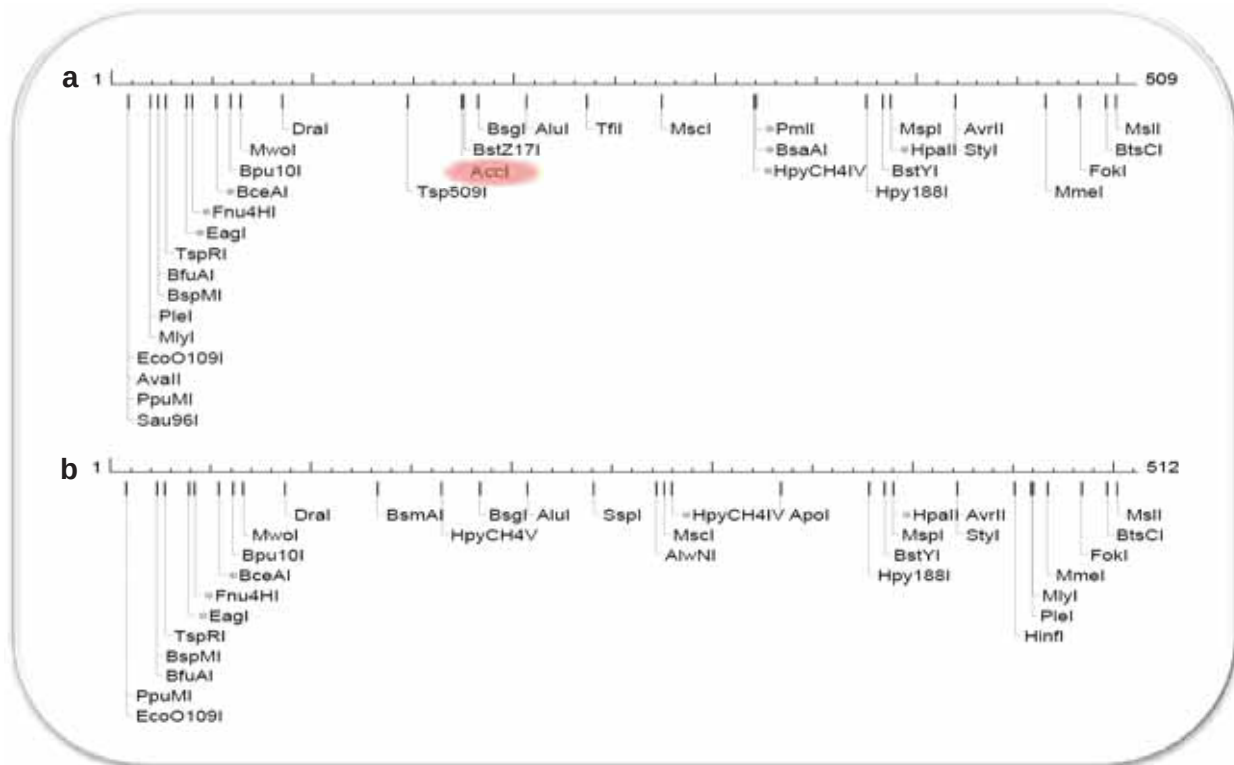


**Figura 9** - Mapas de restrição do gene mitocondrial 16S da espécie *L. macrocephalus* (a) e *L. elongatus* (b). Em destaque a enzima *AccI*, com sítio de restrição apenas em *L. macrocephalus*.

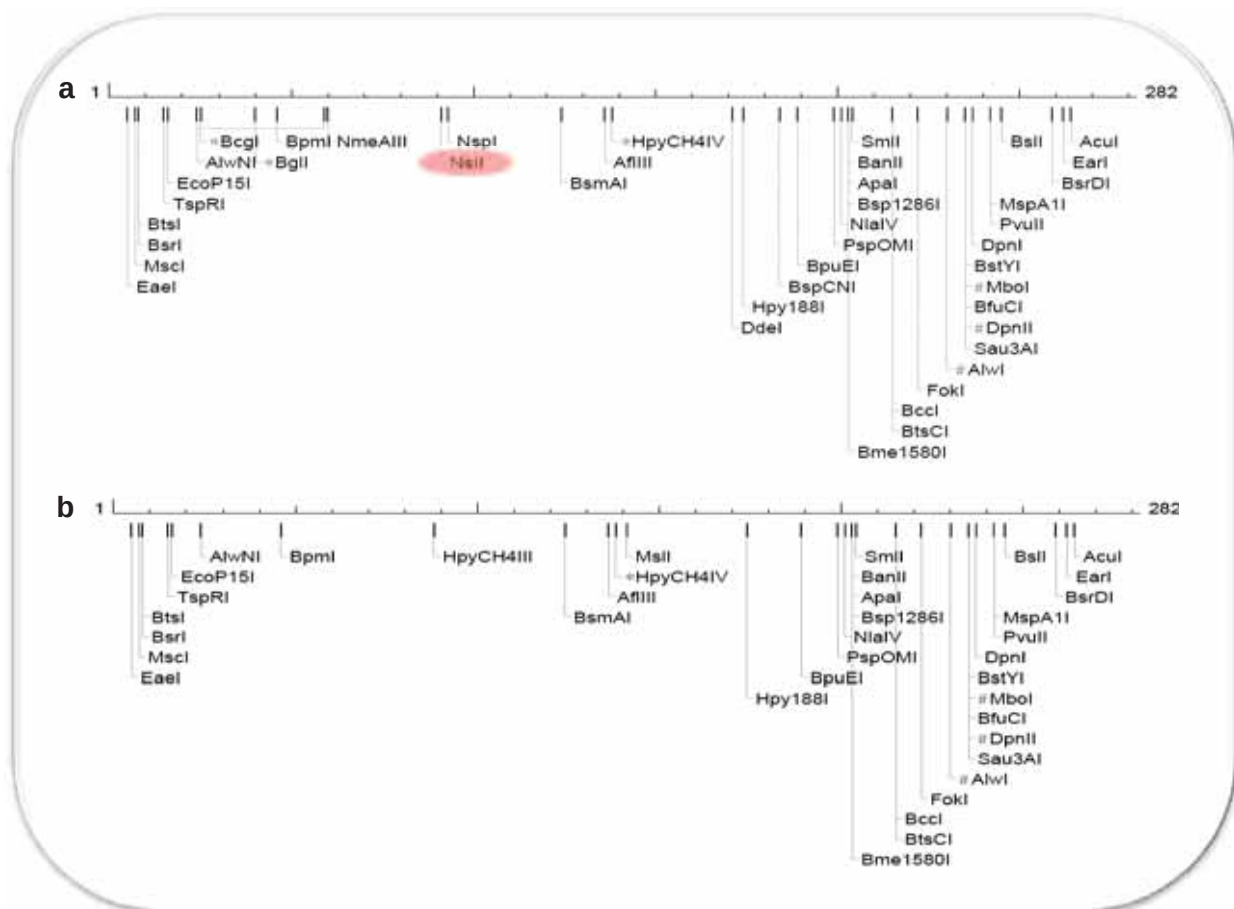


**Figura 10** - Mapas de restrição do gene nuclear TROP para a espécie *L. macrocephalus* (a) e *L. elongatus* (b). Em destaque a enzima *NsiI*, com sítio de restrição apenas em *L. macrocephalus*.

Amplificações do gene mitocondrial 16S (primers 16S *F* e 16S *R*) e uma posterior clivagem pela enzima *AccI*, revelaram nos indivíduos de *L. elongatus* o perfil eletroforético com uma única banda de quase 600 pb, pois não houve sítio de clivagem. Já os exemplares de *L. macrocephalus* apresentaram duas bandas, de aproximadamente 400 pb e 200 pb, produtos resultantes da ação da enzima *AccI*. As amostras de “Piaupara” apresentaram o mesmo perfil eletroforético observado no parental materno *L. macrocephalus* (Figura 11).

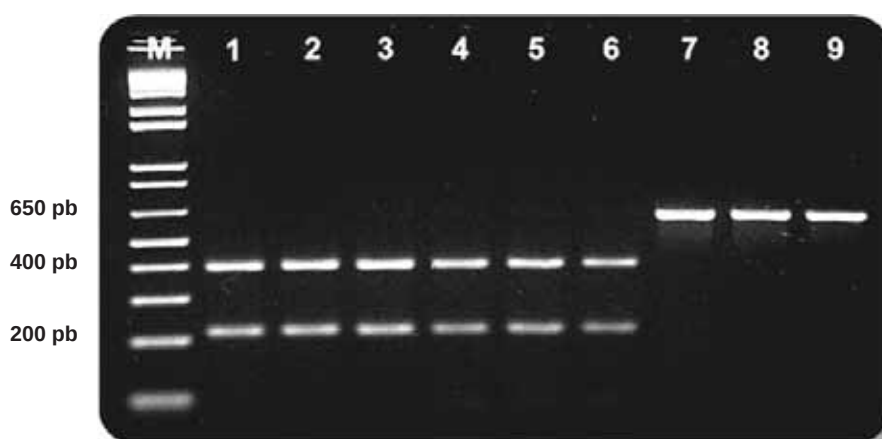


**Figura 11** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene 16S. *Leporinus macrocephalus* (1-3), “Piaupara” (4-6) e *L. elongatus* (7-9). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Amplificações do gene TROP (primers TROP *F* e TROP *R*) submetidas à clivagem pela enzima *NsiI*, revelaram nos indivíduos de *L. elongatus* uma única banda de 300 pb, sem cortes. Já as amostras de *L. macrocephalus* exibiram duas bandas, com cerca de 190 pb e 110 pb, resultantes da ação da enzima *NsiI*. Diferentemente, no híbrido observou-se um padrão de três bandas diagnósticas, com aproximadamente 300 pb, 190 pb e 110 pb, sendo dois herdados de *L. macrocephalus* e um de *L. elongatus*, o que possibilitou sua identificação pelo diagnóstico heterozigótico aos parentais (Figura 12).

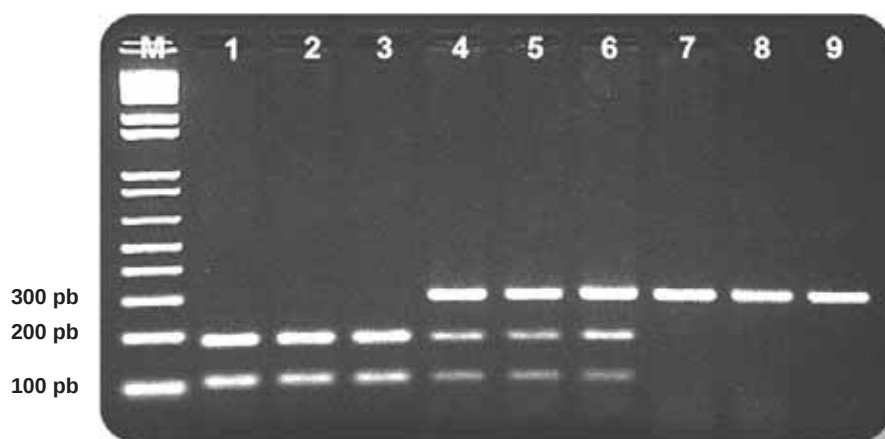


**Figura 12** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene TROP. *Leporinus macrocephalus* (1-3), “Piaupara” (4-6) e *L. elongatus* (7-9). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

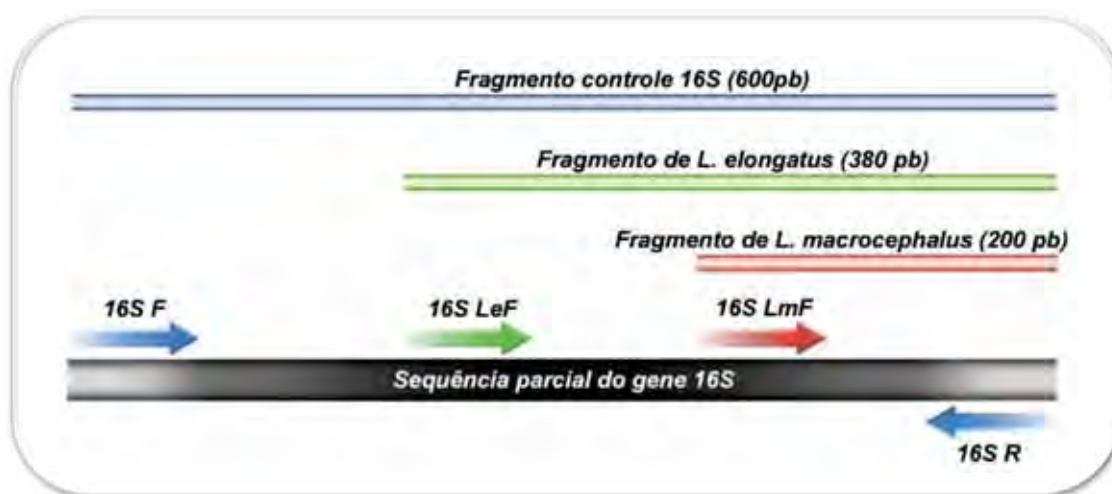
### PCR-Multiplex

Para o gene mitocondrial 16S, os primers foram desenhados para cada espécie, ambos em locais distintos no sentido *Forward*, com o primer 16S *LmF* (específico para *L. macrocephalus*) envolvendo uma região com 7 mutações e o primer 16S *LeF* (específico para *L. elongatus*) englobando 5 mutações (Tabela 6). Estas condições se demonstraram restritas para o gene TROP, cujas sequências apresentaram uma menor divergência genética. Assim, os primers tiveram que ser desenhados aproveitando-se um mesmo sítio polimórfico. Em *L. elongatus* foi selecionada uma região no sentido *Forward* (*TROP LeF*), enquanto que para *L. macrocephalus* escolheu-se uma região no sentido *Reverse* (*TROP LmR*), ambas envolvendo apenas duas mutações (Tabela 6). Outra condição testada foi utilizando o primer *L. macrocephalus* no sentido *Forward* (*TROP LmF*) envolvendo somente uma mutação. Em testes preliminares este último primer demonstrou uma especificidade menor. Desta forma, preferiu-se utilizar o primer *TROP LmR* no presente estudo.

**Tabela 6** - Primers espécie-específicos para amplificação dos genes mitocondrial 16S e nuclear TROP.

| Primers         | Sequências dos primers              |
|-----------------|-------------------------------------|
| <i>16S LmF</i>  | 5'- GCTAAAACCCGATCAACGAAA -3'       |
| <i>16S LeF</i>  | 5'- ACAACTTAAGCCAACCGTGTT -3'       |
| <i>TROP LeF</i> | 5'- GGTGTGTATTGTATAAAGACTTACACC -3' |
| <i>TROP LmR</i> | 5'- ACATGACCTGATACGACACATGCA -3'    |
| <i>TROP LmF</i> | 5'- TCATAGCATGGAACACGTTGC -3'       |

Análises de amplificações do DNA mitocondrial 16S em reação Multiplex (primers *16S F*, *16S R*, *16S LmF* e *16S LeF*) demonstraram em todos os exemplares um fragmento controle de aproximadamente 600 pb. Além disso, os indivíduos de *L. macrocephalus* demonstraram um fragmento diagnóstico com cerca de 200 pb, enquanto que os de *L. elongatus* apresentaram uma banda de 380 pb (Figuras 13 e 14). No entanto, esta diferença não foi suficiente para a identificação do híbrido, que demonstrou um perfil eletroforético idêntico ao de *L. macrocephalus* (Figura 14).

**Figura 13** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene mitocondrial 16S.

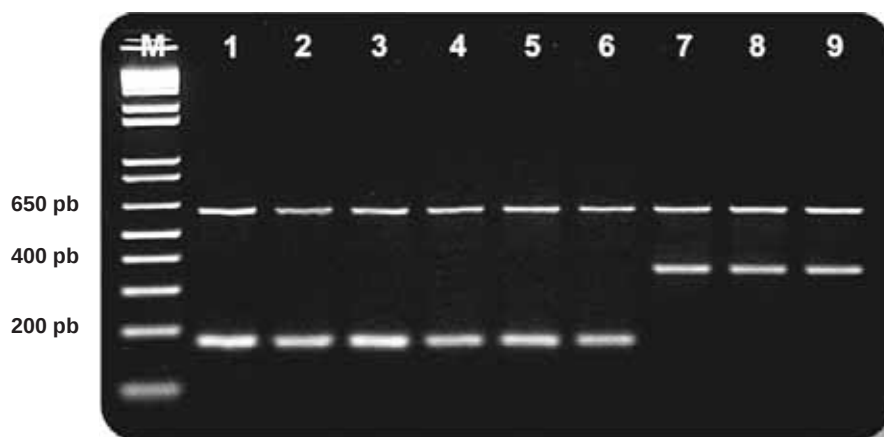


**Figura 14** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene mitocondrial 16S. *Leporinus macrocephalus* (1-3), “Piaupara” (4-6) e *L. elongatus* (7-9). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

A reação PCR-Multiplex do gene TROP (*TROP F*, *TROP R*, *TROP LeF* e *TROP LmR*) exibiu em todas as amostras uma banda controle de aproximadamente 300 pb, além de um fragmento específico para os indivíduos de cada espécie, de cerca de 130 pb para *L. macrocephalus* e de 220 pb para *L. elongatus* (Figuras 15 e 16). Já no híbrido “Piaupara”, observou-se um padrão heterozigótico em relação aos parentais, com duas bandas diagnósticas de aproximadamente 130 pb e 220 pb, cada uma herdada de uma espécie parental (Figura 16).

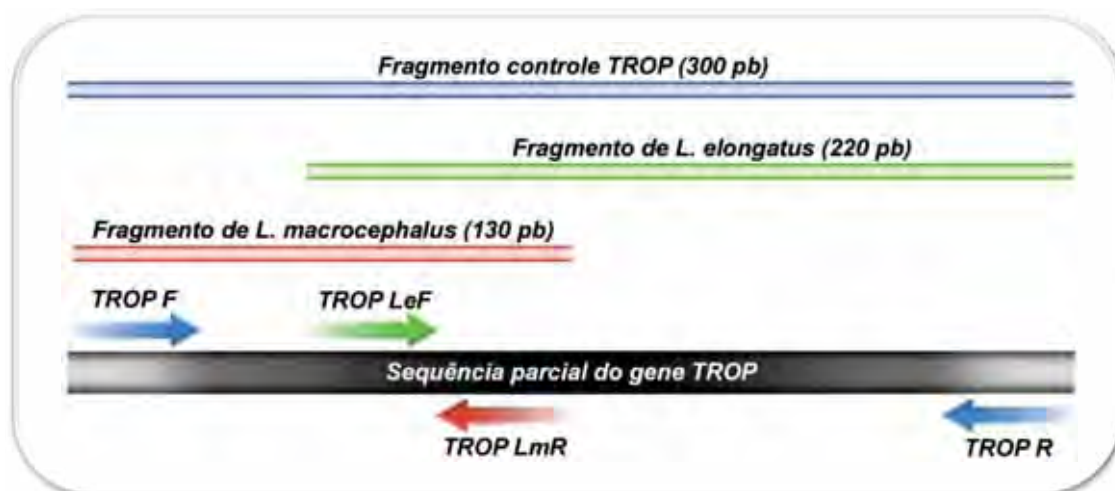


**Figura 15** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene nuclear TROP.

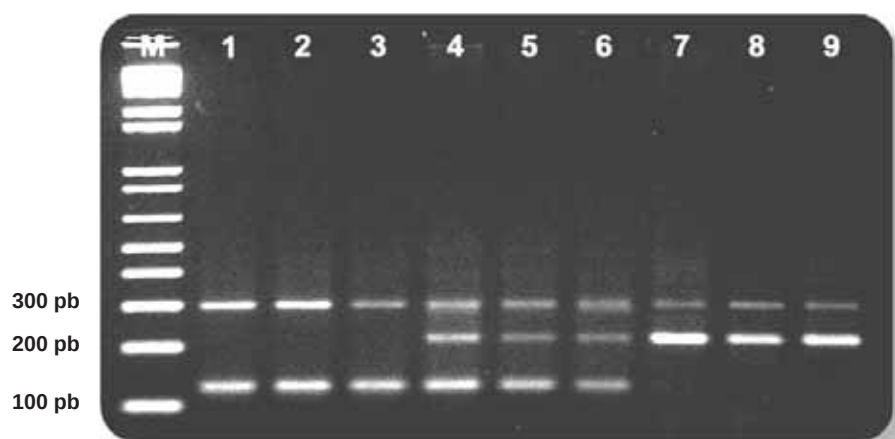


**Figura 16-** Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene nuclear TROP. *Leporinus macrocephalus* (1-3), “Piaupara” (4-6) e *L. elongatus* (7-9). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.1.2 Identificação molecular dos estoques de Piaçu (*Leporinus macrocephalus*)

Primeiramente, o método de identificação das amostras foi através de PCR-Multiplex e, em seguida, uma amostragem destes resultados foi confirmada por PCR-RFLP (Tabela 7). Para a análise dos exemplares comercializados como Piaçu, utilizaram-se os genes nuclear TROP e mitocondrial 16S, estabelecidos no tópico 3.1.1. É importante notar que em todas as reações realizadas nesta fase de análise foram utilizadas amostras de DNA das espécies puras parentais, de forma a servir como controle para a especificidade das reações.

**Tabela 7** - Propriedade, lotes de peixes e número de exemplares (n) analisados por cada metodologia.

| Propriedade         | Lotes comprados         | n   | PCR-Multiplex | PCR-RFLP |
|---------------------|-------------------------|-----|---------------|----------|
| Piscicultura A (SP) | <i>L. macrocephalus</i> | 30  | 30            | 15       |
| Piscicultura C (MS) | <i>L. macrocephalus</i> | 167 | 167           | 40       |
| Piscicultura D (MG) | <i>L. macrocephalus</i> | 100 | 100           | 30       |
| Piscicultura E (SP) | <i>L. macrocephalus</i> | 100 | 100           | 30       |

Nas quatro pisciculturas em que foram comprados exemplares rotulados como *L. macrocephalus* (Piauçu), com base nos resultados utilizando o marcador nuclear por PCR-Multiplex, verificou-se que todas as amostras tinham o padrão molecular da espécie pura *L. macrocephalus*, ou seja, apresentaram exclusivamente a banda diagnóstica para esta espécie (130 pb). Assim, nos lotes desta espécie, não foram encontradas amostras de produtos híbridos (Figuras 17 e 18). Em seguida, as informações geradas por PCR-RFLP também evidenciaram somente o genótipo de *L. macrocephalus*, pois apresentaram duas bandas diagnósticas, com cerca de 190 pb e 110 pb.

Em relação à aplicação do marcador mitocondrial, as análises confirmaram que estes exemplares pertenciam à linhagem de *L. macrocephalus*. Através da PCR-Multiplex, as amostras foram evidenciadas pela presença da banda específica de 200 pb (Figura 18), enquanto que por PCR-RFLP foram evidenciadas por duas bandas características, com aproximadamente 400 pb e 200 pb.

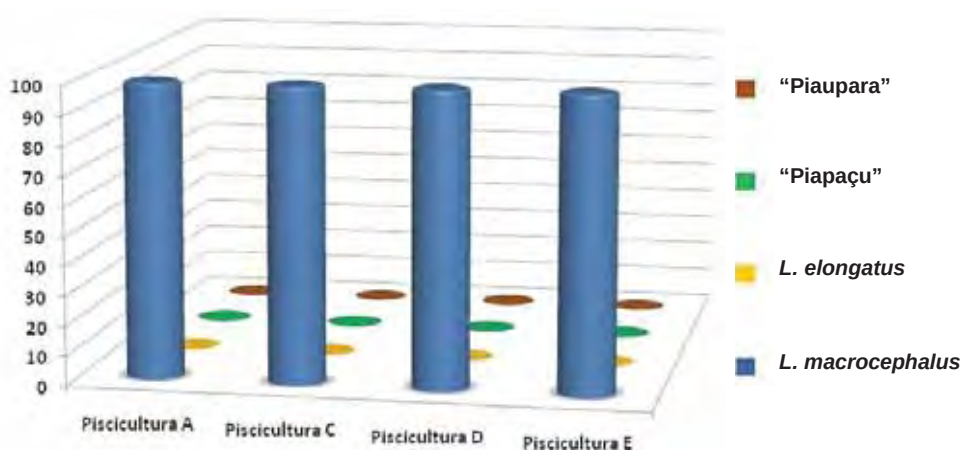


**Figura 17** – Resultados da identificação molecular. Todos os lotes continham somente exemplares de *Leporinus macrocephalus*.

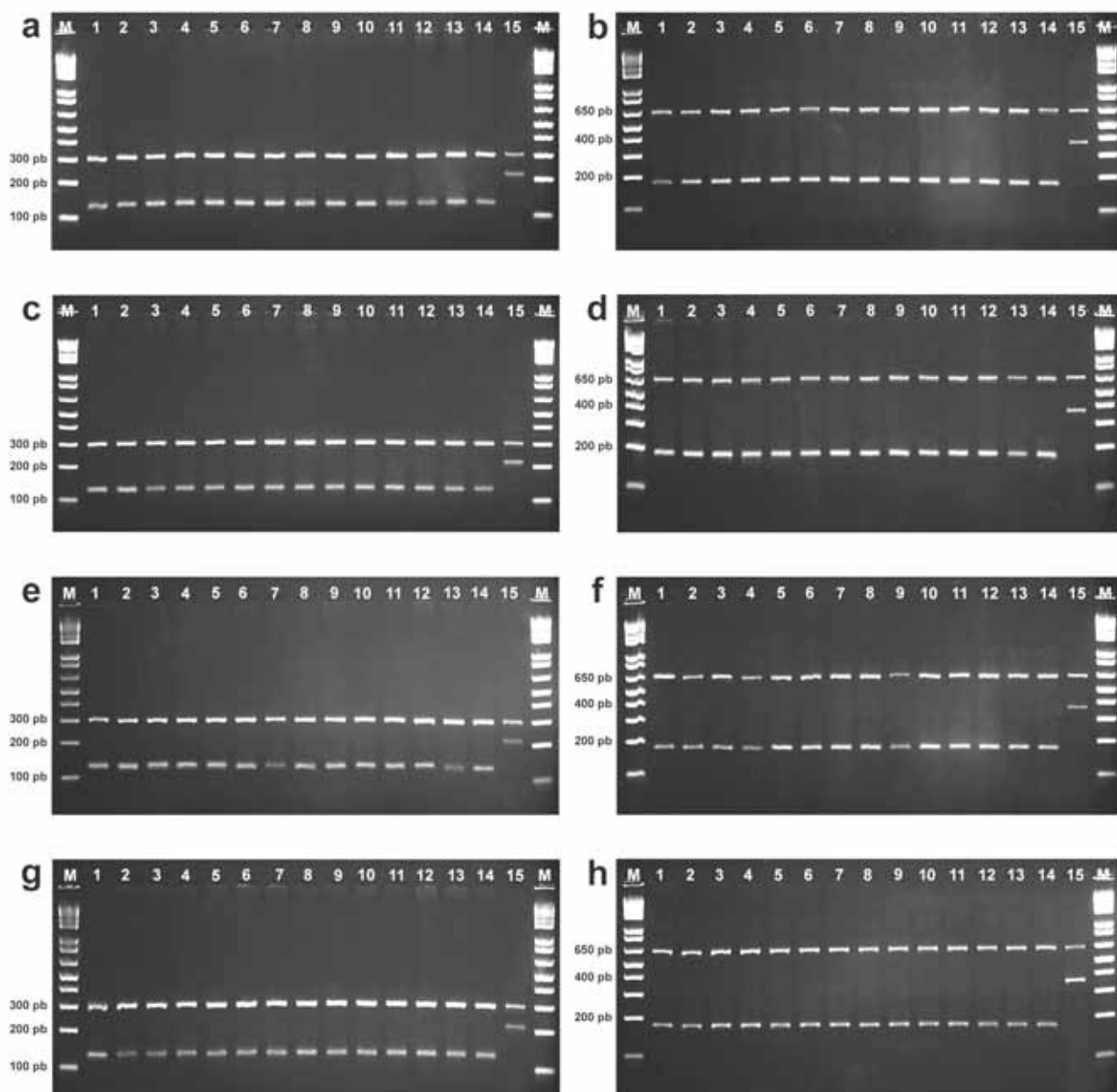


**Figura 18** – Géis de agarose dos padrões de identificação molecular dos estoques utilizando o gene nuclear TROP (géis da esquerda) e mitocondrial 16S (géis da direita) em PCR-Multiplex. (a) e (b) são as amostras compradas como *Leporinus macrocephalus* da Piscicultura A, (c) e (d) da Piscicultura C, (e) e (f) da Piscicultura D, (g) e (h) da Piscicultura E. Em todos os géis, as colunas 1-13 correspondem aos padrões de identificação de *L. macrocephalus*. Colunas 14 e 15 são amostras de DNA das espécies puras *L. macrocephalus* e *L. elongatus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.2.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e *Piaractus brachypomus*

Em relação ao genoma mitocondrial, foram sequenciadas regiões correspondentes à parte dos genes Citocromo B (CYTB) e Citocromo C oxidase subunidade I (COI), enquanto que, dos genes nucleares, foram obtidas sequências parciais da  $\alpha$ -tropomiosina (TROP) e Gene Ativador da Recombinação 2 (*Recombination Activating Gene 2* - RAG2). Os resultados demonstraram que estas sequências foram suficientes para a identificação molecular das espécies *C. macropomum*, *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*, com algumas diferenças de composição nucleotídica. Apesar de terem sido utilizados apenas os híbridos “Tambacu”, “Tambatinga” e “Patinga” neste estudo, os marcadores estabelecidos permitem a identificação genética de todos os híbridos resultantes dos cruzamentos envolvendo as três espécies.

Os resultados obtidos pelo sequenciamento permitiram a análise de 708 pb do gene COI (76 sítios polimórficos), 665 pb do gene CYTB (70 sítios polimórficos), 302 pb do gene TROP (8 sítios polimórficos) e de 750 pb do gene RAG2 (21 sítios polimórficos), que foram associados com uma média de divergência genética de 0.079, 0.077, 0.019 e 0.019, respectivamente. A menor divergência genética foi observada entre as espécies *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*, com valores de 0.004 (COI), 0.006 (CYTB), 0.010 (TROP) e 0.003 (RAG2), o que tornou difícil encontrar enzimas com cortes espécie-específicos e o desenho de primers para esses fragmentos de DNA. A comparação dessas espécies com *C. macropomum* indicaram maiores diferenças genéticas, com valores médios de 0.116 (COI), 0.112 (CYTB), 0.023 (TROP) e 0.027 (RAG2).

## PCR-RFLP

Através dos mapas de restrição do gene CYTB, foi possível identificar algumas enzimas de restrição com corte único e espécie-específicas para a diferenciação das espécies parentais (Figura 19). Para este estudo, como padronização da metodologia, selecionamos as enzimas BtgI e BsrGI, com digestão enzimática nos genes de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*, respectivamente. Em relação ao gene COI, foram encontradas algumas enzimas com padrões de clivagem única e exclusiva no DNA de *C. macropomum*, mas nenhuma enzima foi identificada com estas características para diferenciação das espécies *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*. Assim, o gene COI não foi utilizado para a metodologia de PCR-RFLP.

Nos mapas de restrição do gene nuclear RAG2, foram identificadas algumas enzimas com clivagem gênica capazes de produzir padrões diagnósticos para a diferenciação das três espécies (Figura 20). Assim, as enzimas AleI e BsmFI foram selecionadas para a técnica de PCR-RFLP, com clivagens nos genes de *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente. Para o gene TROP, enzimas com cortes espécie-específicos para a diferenciação das três espécies não foram identificados nos mapas de restrição e, portanto, este gene não foi selecionado para aplicação do método de PCR-RFLP.

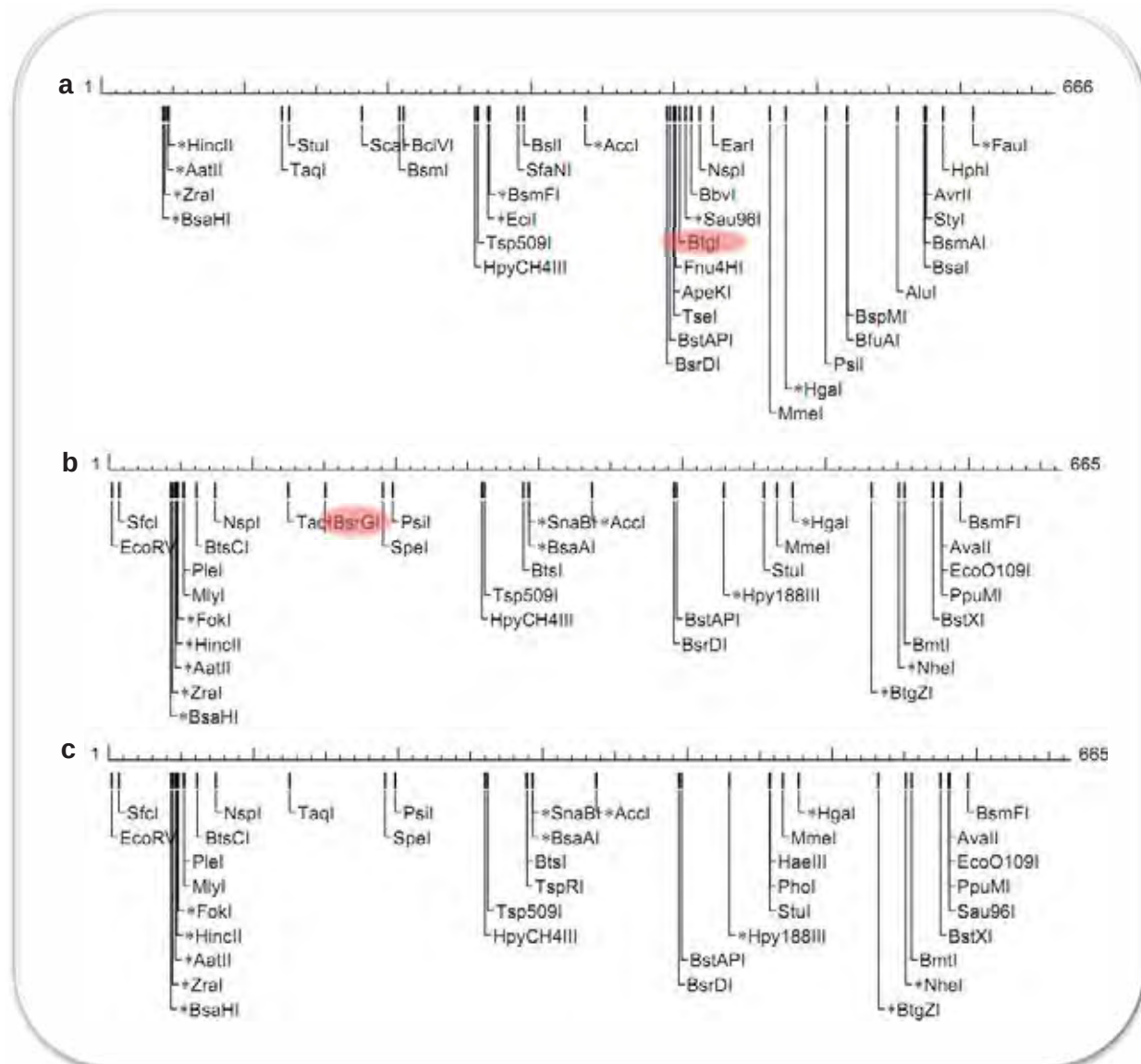


**Figura 19** - Mapas de restrição do gene mitocondrial CYTB para as espécies *Colossoma macropomum* (a), *Piaractus mesopotamicus* (b), e *P. brachypomus* (c). Em destaque, as enzimas BtgI e BsrGI, com sítio de restrição apenas em *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*, respectivamente.

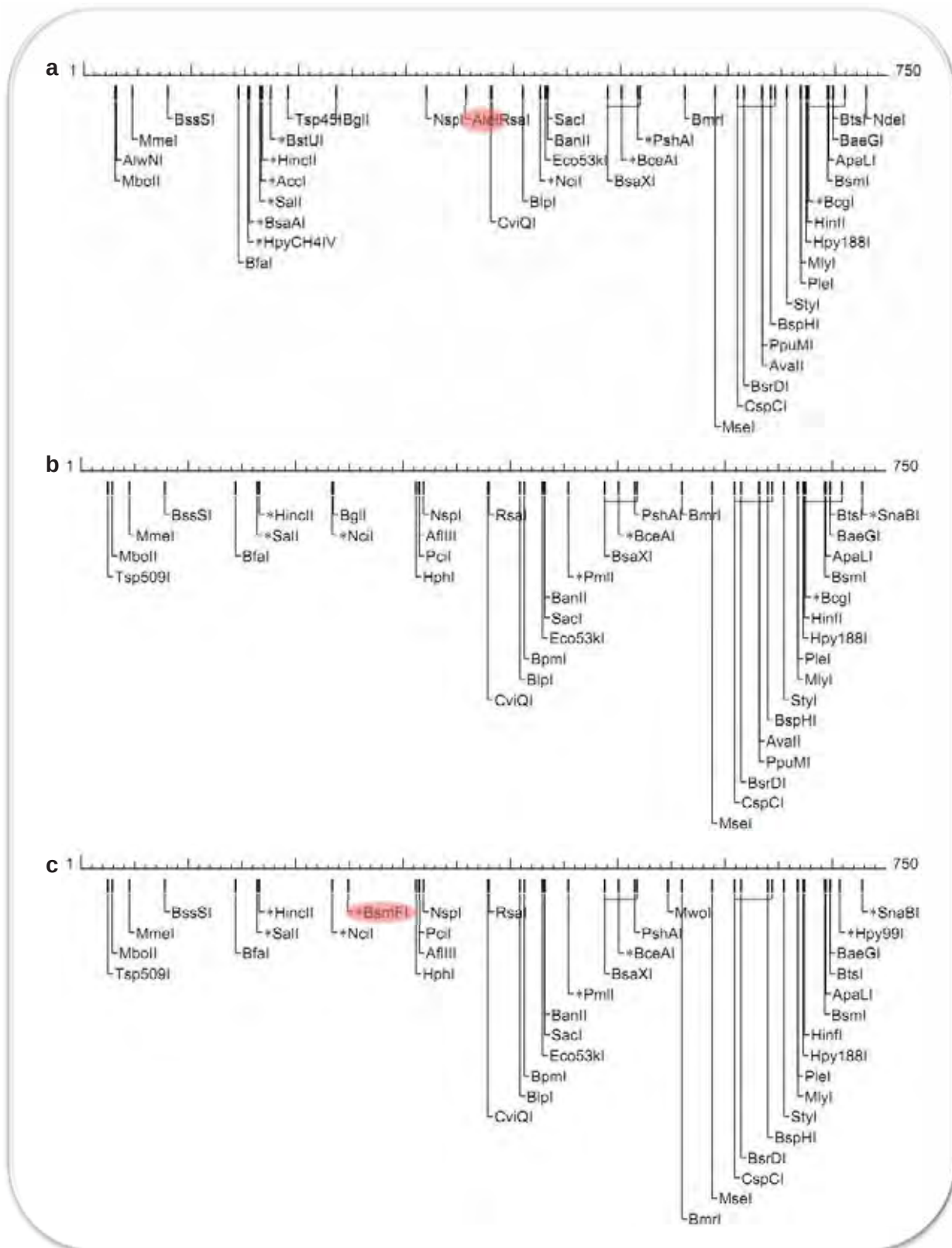


**Figura 20** - Mapas de restrição do gene nuclear RAG2 para as espécies *Colossoma macropomum* (a), *Piaractus mesopotamicus* (b), e *P. brachypomus* (c). Em destaque, as enzimas AluI e BsmFI, com sítio de restrição apenas em *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente.

A amplificação do gene mitocondrial CYTB (primers *CYTB SerraF* e *CYTB SerraR*) e posterior digestão usando as enzimas BtgI e BsrGI revelou padrões de eletroforese distintos entre as espécies parentais. A espécie *P. brachypomus* exibiu uma única banda de 665 pb, porque não apresentava sítio de clivagem das enzimas em sua sequência CYTB. Em contraste, *P. mesopotamicus* apresentou duas bandas diagnósticas, uma de 513 pb e outra de 152 pb, resultante da ação de clivagem pela enzima BsrGI. O padrão de diferenciação de *C. macropomum* foi caracterizada pela presença de dois marcadores de diferentes tamanhos, 405 pb e 261 pb, que foram os produtos gerados pela digestão da enzima BtgI. A aplicação desta técnica nos híbridos revelou o mesmo genótipo observado nas espécies maternas, isto é, de *P. mesopotamicus* para o híbrido “Patinga” e de *C. macropomum* para as linhagens híbridas “Tambacu” e “Tambatinga” (Figura 21).

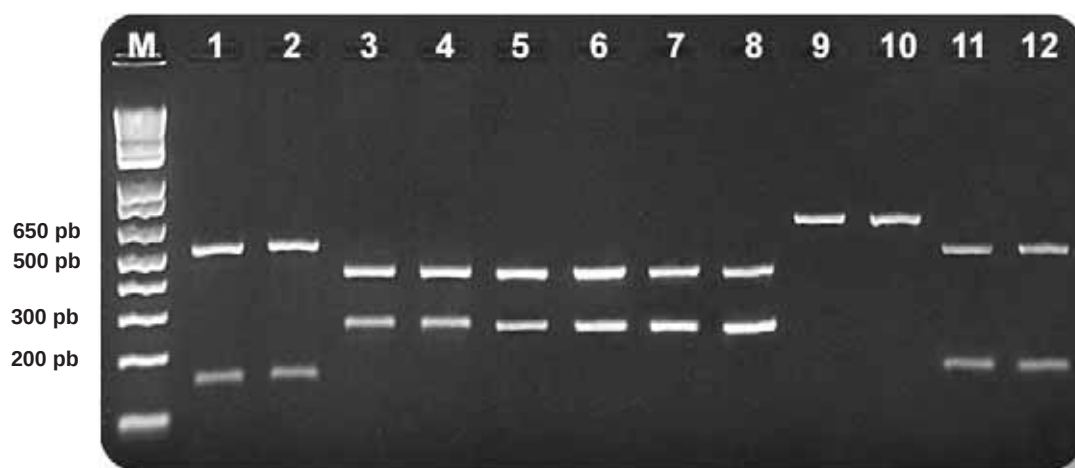


**Figura 21** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene mitocondrial CYTB. *Piaractus mesopotamicus* (1-2), “Tambacu” (3-4), *Colossoma macropomum* (5-6), “Tambatinga” (7-8), *P. brachypomus* (9-10) e “Patinga” (11-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

No que se refere ao gene nuclear RAG2, a amplificação deste fragmento gênico (primers *RAG2 SerraF* e *RAG2 SerraR*) seguida pela digestão com as

enzimas de restrição AleI e BsmFI demonstrou diferentes genótipos para a identificação molecular das espécies parentais. Os indivíduos da espécie *P. mesopotamicus* apresentaram um único alelo de 750 pb, sem cortes. Em contrapartida, como resultado da clivagem gênica pelas enzimas AleI e BsmFI, os exemplares de *P. brachypomus* apresentaram duas bandas diagnósticas de 250 pb e 500 pb, enquanto que as amostras de *C. macropomum* exibiram fragmentos de 357 pb e 393 pb. Em relação às gerações híbridas, nas amostras de “Tambatinga” um padrão de quatro marcadores foi observado (250 pb, 357 pb, 393 pb e 500 pb): dois herdados de *P. brachypomus* e dois de *C. macropomum*. O padrão de diagnóstico do híbrido “Tambacu” foi marcado pela presença de três bandas (357 pb, 393 pb e 750 pb): duas de *C. macropomum* e uma de *P. mesopotamicus*. Da mesma forma, no híbrido “Patinga” três fragmentos característicos foram observados (250 pb, 500 pb e 750 pb), mas de tamanhos diferentes em comparação com o híbrido “Tambacu”, pois duas bandas foram herdadas de *P. brachypomus* e uma de *P. mesopotamicus* (Figura 22).

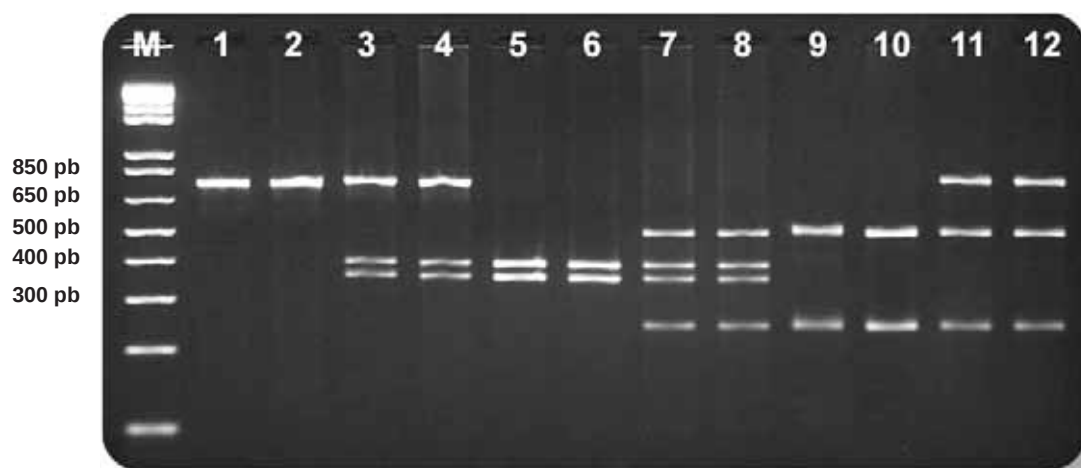


**Figura 22** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene nuclear RAG2. *Piaractus mesopotamicus* (1-2), “Tambacu” (3-4), *Colossoma macropomum* (5-6), “Tambatinga” (7-8), *P. brachypomus* (9-10) e “Patinga” (11-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### PCR-Multiplex

Para o gene mitocondrial COI, primers específicos foram caracterizados para as espécies em diferentes regiões da sequência e posicionados no sentido *Reverse* da fita de DNA (Tabela 8). O primer *COI CmR* foi desenhado numa região com 4 mutações e desenvolvido para o diagnóstico de *C. macropomum*, enquanto que o primer *COI PbR* envolvia um sítio com 6 mutações e caracterizado especificamente para *P. brachypomus*. No entanto, com base nas análises da sequência do gene COI de *P. mesopotamicus*, não foi possível desenhar um primer específico para esta espécie, uma vez que nenhum sítio polimórfico com nucleotídeos diagnósticos foi encontrado. Portanto, o primer *COI PiaractusR*, englobando um local com 4 mutações, foi desenvolvido para as espécies de *Piaractus* no intuito de servir como controle de reação para a espécie *P. mesopotamicus*.

Da mesma forma, para o gene nuclear TROP foram estabelecidos primers em diferentes locais e diagnósticos para cada espécie, todos no sentido *Reverse* (Tabela 8). O primer *TROP CmR* foi posicionado em duas mutações e específico para *C. macropomum*, *TROP PmR* diferenciado em apenas uma mutação para *P. mesopotamicus* e, por fim, *TROP PbR* englobando 11 mutações e caracterizado para *P. brachypomus*. Para obtenção de melhor desempenho e especificidade das reações de PCR-Multiplex, foi desenhado um primer *Forward (TROP SerraF)* para ser utilizado juntamente com os primers específicos, ao invés de utilizar o primer universal *TROP F* nas reações de Multiplex.

Para os genes mitocondrial CYTB e nuclear RAG2, não foram desenvolvidos primers espécie-específicos, pois os pontos de mutações que diferiram entre as sequências das três espécies não foram considerados como locais ideais para o desenho de primers.

**Tabela 8** - Primers espécie-específicos para amplificação dos genes mitocondrial COI e nuclear TROP.

| Primers               | Sequências dos primers          |
|-----------------------|---------------------------------|
| <i>COI CmR</i>        | 5'- AGCAAGATGGAGTGAGAAAATA -3'  |
| <i>COI PbR</i>        | 5'- CTGTCAGAAGTATAGTAATTCCG -3' |
| <i>COI PiaractusR</i> | 5'- GAAGGAAGGATGGGGGTAGG -3'    |
| <i>TROP CmR</i>       | 5'- ATACAACAATGCCATCGCT -3'     |
| <i>TROP PbR</i>       | 5'- TTGACTTTATGCCACACAAAT -3'   |
| <i>TROP PmR</i>       | 5'- CTTCAGCTGGATCTCCTGA -3'     |
| <i>TROP SerraF</i>    | 5'-GAGTTGGATCGGGCTCAG-3'        |

Análises de amplificações do DNA mitocondrial COI nas reações Multiplex (primers *COI F*, *COI CmR*, *COI PbR* e *COI PiaractusR*) resultaram em diferentes perfis de eletroforese entre *C. macropomum*, *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*. Cada primer sintetizado possibilitou gerar um fragmento de tamanho diferente, produzindo genótipos diagnósticos para cada espécie (Figuras 23 e 24). Os indivíduos de *C. macropomum* demonstraram especificamente um alelo de amplificação de 435 pb, enquanto as espécies *Piaractus* apresentaram uma banda diagnóstica de 307 pb, além das amostras de *P. brachypomus* exibirem um marcador adicional de 610 pb. Os híbridos apresentaram o mesmo genótipo observado nas espécies maternas, de modo que este marcador não poderia ser utilizado para detecção de híbridos, ou seja, o híbrido “Patinga” apresentou o perfil de *P. mesopotamicus*, e os híbridos “Tambacu” e “Tambatinga” tiveram o da espécie *C. macropomum* (Figura 24).

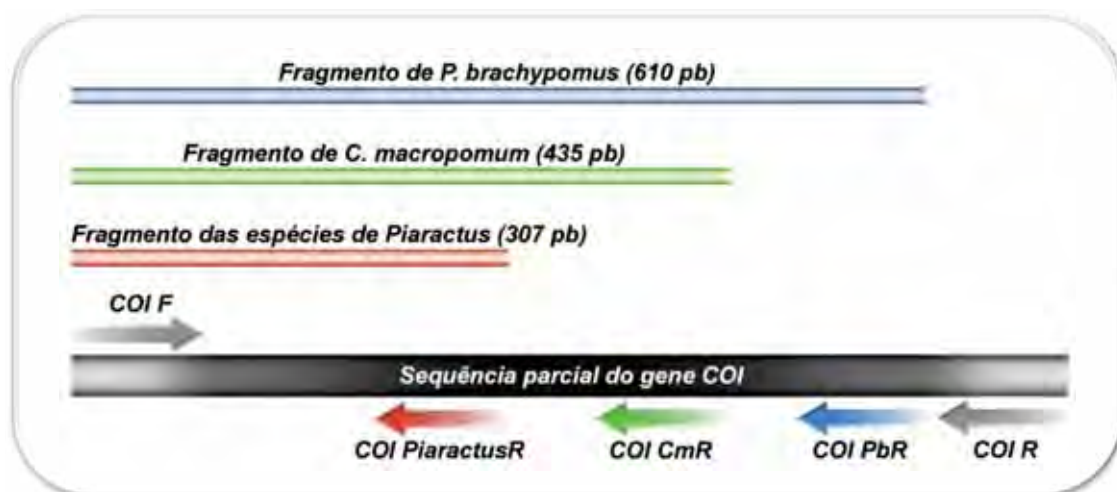


**Figura 23** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene mitocondrial COI.



**Figura 24** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene mitocondrial COI. *Piaractus mesopotamicus* (1-2), "Tambacu" (3-4), *Colossoma macropomum* (5-6), "Tambatinga" (7-8), *P. brachypomus* (9-10) e "Patinga" (11-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

As reações de PCR-Multiplex do gene nuclear TROP (primers *TROP CmR*, *TROP PmR*, *TROP PbR* e *TROP SerraF*) também demonstraram diferentes genótipos entre as espécies parentais (Figuras 25 e 26). Os resultados mostraram um alelo distinto e característico para cada espécie, que era de aproximadamente 172 pb para *C. macropomum*, 269 pb para *P. mesopotamicus* e 131 pb para *P.*

*brachypomus*. Nas amostras híbridas, foram observados genótipos heterozigotos com duas bandas diagnósticas, cada uma das quais foi herdada de um genoma parental. Portanto, os marcadores característicos para o híbridos foram de 269 pb e 172 pb para “Tambacu”, 172 pb e 131 pb para “Tambatinga”, e 269 pb e 131 pb para “Patinga” (Figura 26).

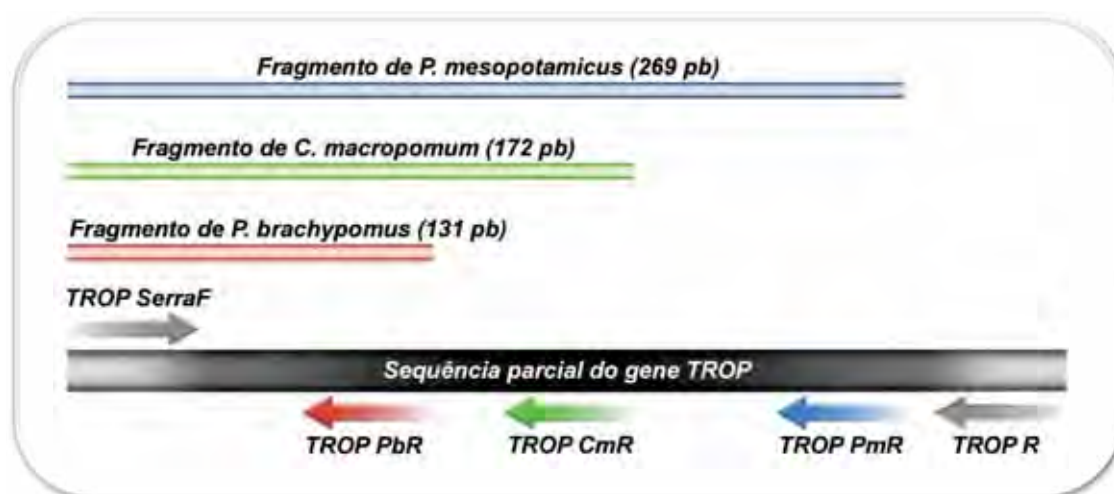


**Figura 25** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene nuclear TROP.

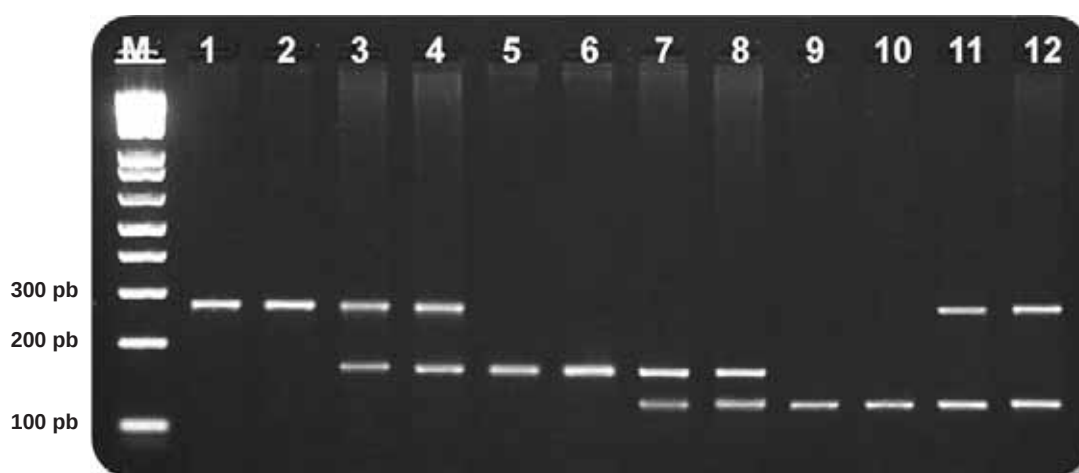


**Figura 26** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene nuclear TROP. *Piaractus mesopotamicus* (1-2), “Tambacu” (3-4), *Colossoma macropomum* (5-6), “Tambatinga” (7-8), *P. brachypomus* (9-10) e “Patinga” (11-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.2.2. Identificação molecular de lotes dos peixes serrasalmídeos

Com o intuito de caracterizar os lotes de peixes serrasalmídeos, as análises de identificação foram de acordo com a seguinte sistemática: inicialmente todas as amostras foram analisadas através dos marcadores de PCR-Multiplex e, posteriormente, uma amostragem destes resultados foi confirmada pela técnica de PCR-RFLP (Tabela 9). Deste modo, foram utilizados os genes nucleares TROP e RAG2, e mitocondriais COI e CYTB, estabelecidos no tópico **3.2.1**. É importante ressaltar que em todas as reações PCR-Multiplex e PCR-RFLP realizados nesta fase de análise foram aplicadas amostras de DNA das espécies puras, de forma a servir como controle para a especificidade das reações.

**Tabela 9** - Propriedade, lotes de peixes e número de exemplares (n) analisados por cada metodologia.

| Propriedade         | Lotes comprados         | n   | PCR-Multiplex | PCR-RFLP |
|---------------------|-------------------------|-----|---------------|----------|
| Piscicultura A (SP) | “Tambacu”               | 50  | 50            | 15       |
| Piscicultura B (SP) | <i>C. macropomum</i>    | 36  | 36            | 15       |
|                     | “Tambacu”               | 44  | 44            | 15       |
|                     | “Patinga”               | 49  | 49            | 15       |
| Piscicultura C (MS) | “Tambacu”               | 158 | 158           | 30       |
| Piscicultura D (MG) | <i>C. macropomum</i>    | 143 | 143           | 30       |
|                     | <i>P. mesopotamicus</i> | 115 | 115           | 30       |
|                     | “Tambacu”               | 133 | 133           | 30       |
| Piscicultura F (SE) | <i>C. macropomum</i>    | 150 | 150           | 30       |
|                     | “Tambacu”               | 150 | 150           | 30       |
|                     | “Tambatinga”            | 150 | 150           | 30       |

Nas amostras compradas como híbrido “Tambacu” das Pisciculturas **A** e **C**, utilizando o marcador nuclear TROP (PCR-Multiplex), de forma esperada todos os peixes foram evidenciados por um genótipo heterozigoto (172 pb e 269 pb), sendo assim, caracterizados como híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* (Figura 27). Através do marcador mitocondrial COI (PCR-Multiplex), o padrão de eletroforese destes exemplares híbridos foi evidenciado pela banda específica de *C. macropomum* (435 pb), portanto, reconhecidos como “Tambacu” (Figura 27).

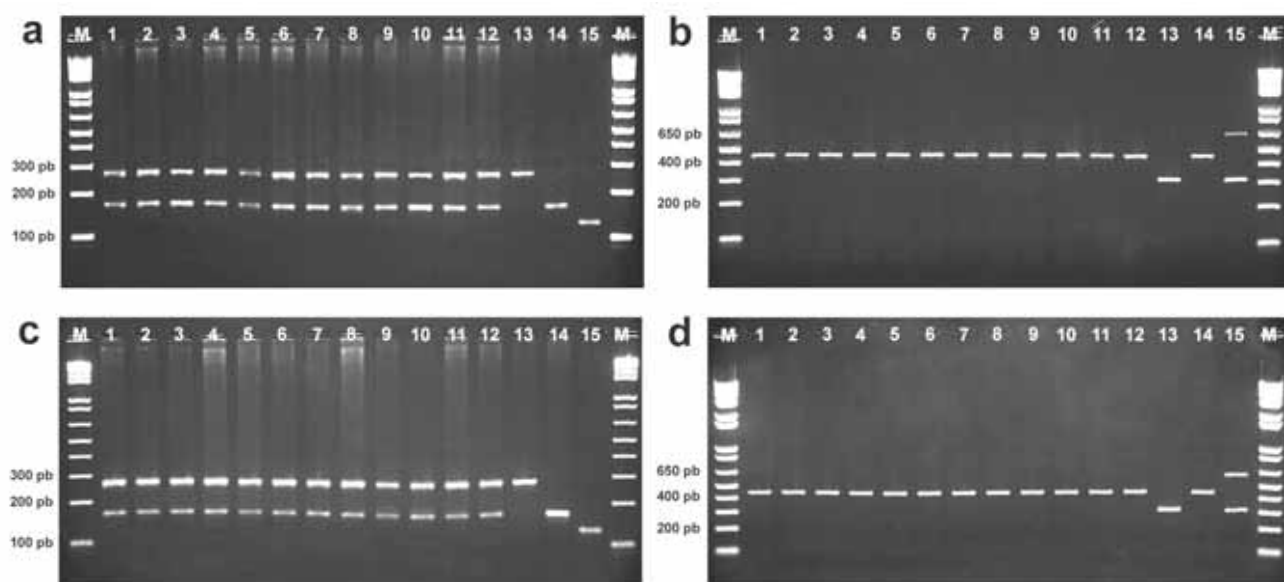


**Figura 27** – Padrões de identificação molecular dos estoques de “Tambacu” da Piscicultura **A** em (a) e (b), e da Piscicultura **C** em (c) e (d), utilizando o gene nuclear TROP (géis da esquerda) e mitocondrial COI (géis da direita) em PCR-Multiplex. Em (a) e (c), colunas **1-12** correspondem ao padrão de identificação de “Tambacu”. Em (b) e (d), colunas **1-12** mostram o padrão mitocondrial de *C. macropomum*. Colunas **13, 14** e **15** são amostras de DNA das espécies puras *P. mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; **M**, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Em relação aos peixes da Piscicultura **D**, nas amostras dos estoques de *C. macropomum*, *P. mesopotamicus* e “Tambacu” foram encontrados os mesmos resultados de identificação molecular. Através do gene nuclear TROP (PCR-Multiplex), foi observado um genótipo composto por duas bandas diagnósticas (172

pb e 269 pb), cuja identificação é de híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* (Figura 28). Com o marcador mitocondrial COI (PCR-Multiplex), todos os exemplares apresentaram o genótipo de *C. macropomum* (435 pb), o que demonstrou que eram híbridos “Tambacu” (Figura 28). Desta forma, os estoques de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* foram comercializados de forma inadequada, ou seja, foram rotulados como espécies puras, mas na verdade eram constituídas apenas por exemplares híbridos.

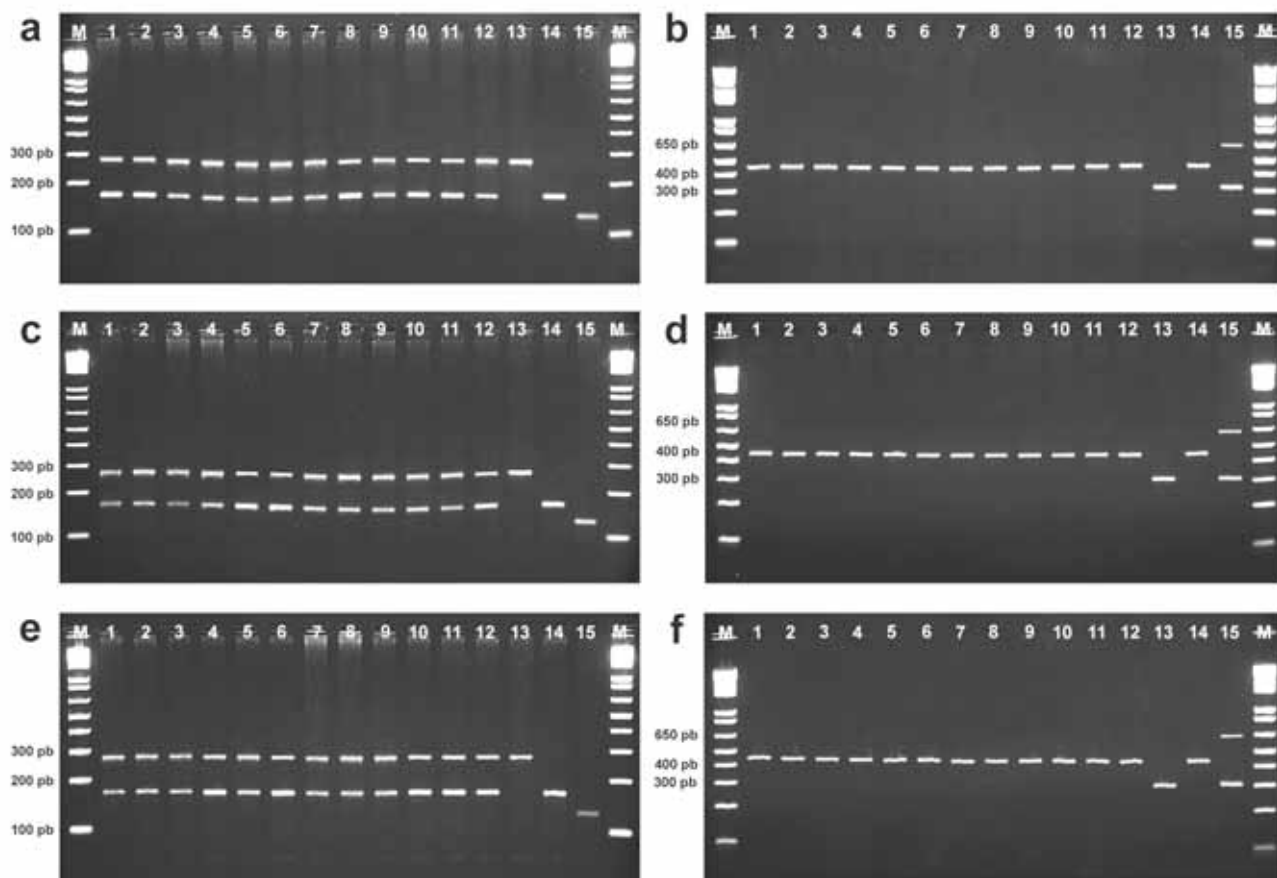


**Figura 28** – Padrões de identificação molecular dos estoques da Piscicultura D utilizando o gene nuclear TROP (géis da esquerda) e mitocondrial COI (géis da direita) em PCR-Multiplex. (a) e (b) são as amostras compradas como *Colossoma macropomum*, (c) e (d) de *Piaractus mesopotamicus*, (e) e (f) de “Tambacu”. Em (a), (c) e (e), colunas 1-12 correspondem ao padrão de identificação de “Tambacu”. Em (b), colunas 1-12 mostram o padrão mitocondrial de *C. macropomum*. Colunas 13, 14 e 15 são amostras de DNA das espécies puras *P. mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Similarmente aos dados encontrados para os lotes da Piscicultura **D**, os juvenis de peixes dos estoques de *C. macropomum*, “Tambacu” e “Tambatinga” da Piscicultura **F** revelaram os mesmos padrões de identificação molecular, ou seja, através do marcador nuclear todas as amostras foram identificadas como sendo de híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* e, por meio do marcador mitocondrial, foi verificado que estes correspondiam à linhagem de “Tambacu” (Figura 29). Consequentemente, os peixes dos lotes de *C. macropomum* e “Tambatinga” foram vendidos como exemplares híbridos de “Tambacu”.

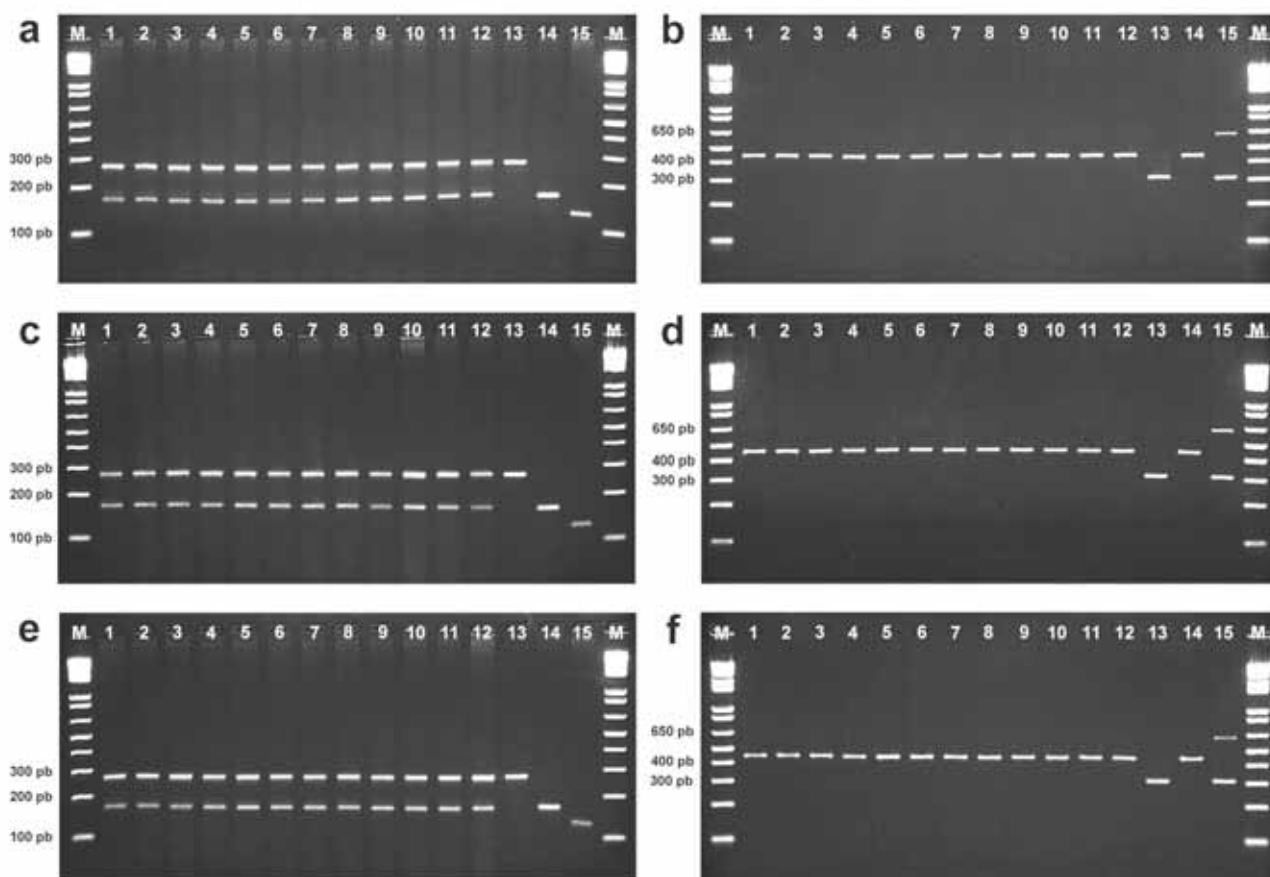


**Figura 29** – Padrões de identificação molecular dos estoques da Piscicultura **F** utilizando o gene nuclear TROP (géis da esquerda) e mitocondrial COI (géis da direita) em PCR-Multiplex. (a) e (b) são as amostras compradas como *Colossoma macropomum*, (c) e (d) de “Tambacu”, (e) e (f) de “Tambatinga”. Em (a), (c) e (e), colunas 1-12 correspondem ao padrão de identificação de “Tambacu”. Em (b), colunas 1-12 mostram o padrão mitocondrial de *C. macropomum*. Colunas 13, 14 e 15 são amostras de DNA das espécies puras *P. mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Em relação às amostras da Piscicultura **B**, foi evidenciada uma grande heterogeneidade de produtos, que estavam misturados nos lotes. Nas amostras rotuladas como Tambaqui (*C. macropomum*), com base do marcador nuclear TROP (PCR-Multiplex), 33 exemplares foram diagnosticados como *C. macropomum* (172 pb); no entanto, três amostras foram identificadas como híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* (172 pb e 269 pb) (Figura 30), o que demonstrou que estes foram comercializados erroneamente neste estoque. Com o marcador mitocondrial COI, os resultados mostraram que em todas as amostras, incluindo os exemplares diagnosticados como híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*, o padrão de identificação foi de *C. macropomum* (435 pb), o que indicou que os produtos híbridos correspondiam à geração “Tambacu” (Figura 30).

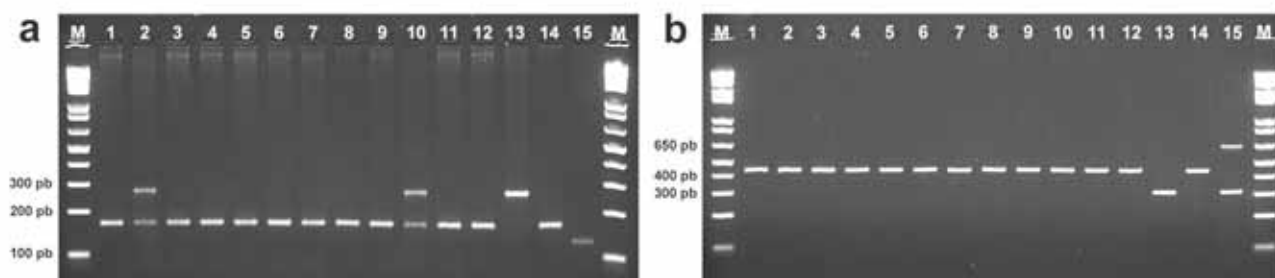


**Figura 30** - Padrões de identificação molecular do estoque de *Colossoma macropomum* da Piscicultura **B**. (a) e (b) são resultados correspondentes ao método PCR-Multiplex dos genes nuclear TROP e mitocondrial COI, respectivamente. Em (a), as colunas **1**, **3-9**, **11** e **12** correspondem aos padrões de identificação de *C. macropomum*, enquanto que **2** e **10** são de híbridos “Tambacu”. Em (b), colunas **1-12** mostram o padrão de *C. macropomum*. Colunas **13**, **14** e **15** são amostras de DNA das espécies puras *Piaractus mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; **M**, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Já no estoque vendido como híbridos “Tambacu” da Piscicultura **B**, as análises do marcador nuclear TROP detectaram uma mistura de dois diferentes produtos sendo comercializados no mesmo lote: 34 juvenis foram caracterizados

como híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* (172 pb e 269 pb); e 10 exemplares foram diagnosticados como híbridos entre *C. macropomum* e *P. brachypomus* (172 pb e 131 pb) (Figura 31). Estes últimos indivíduos não eram esperados na análise e, desta forma, foram comercializados misturados neste lote. Usando o marcador mitocondrial COI, os dados revelaram que em todas as unidades foram identificadas apenas o alelo de 435 pb, específico da espécie *C. macropomum*, indicando que esses produtos correspondiam aos híbridos “Tambacu” e “Tambatinga”, respectivamente.

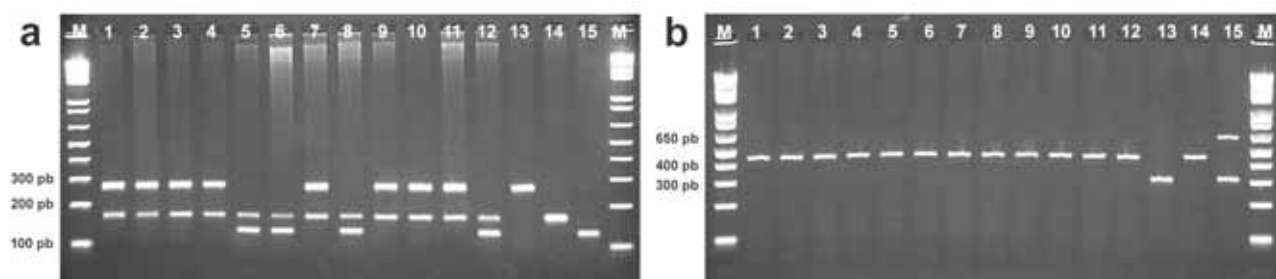


**Figura 31** - Padrões de identificação molecular do estoque de “Tambacu” da Piscicultura B. (a) e (b) são resultados correspondentes ao método PCR-Multiplex dos genes nuclear TROP e mitocondrial COI, respectivamente. Em (a), as colunas **1-4, 7, 9-11** correspondem aos padrões de identificação de “Tambacu”, enquanto que **5, 6, 8 e 12** são de híbridos “Tambatinga”. Em (b), colunas **1-12** mostram o padrão de *C. macropomum*. Colunas **13, 14 e 15** são amostras de DNA das espécies puras *P. mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; **M**, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Finalmente, nas amostras comercializadas como “Patinga” da Piscicultura B, as análises do gene nuclear indicaram uma grande variedade de produtos: 11 indivíduos de *C. macropomum*, oito exemplares de *P. mesopotamicus*, oito amostras de *P. brachypomus*, uma amostra híbrida entre *C. macropomum* e *P. brachypomus*, e 21 indivíduos híbridos entre *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus* (Figura 32). Através do marcador mitocondrial COI, os híbridos entre *C. macropomum* e *P. brachypomus* revelaram o genótipo de *C. macropomum*, correspondendo ao híbrido

“Tambatinga”. Para os híbridos entre *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*, o genótipo COI foi de *P. mesopotamicus* e, conseqüentemente, os híbridos foram identificados como “Patinga” (Figura 32).

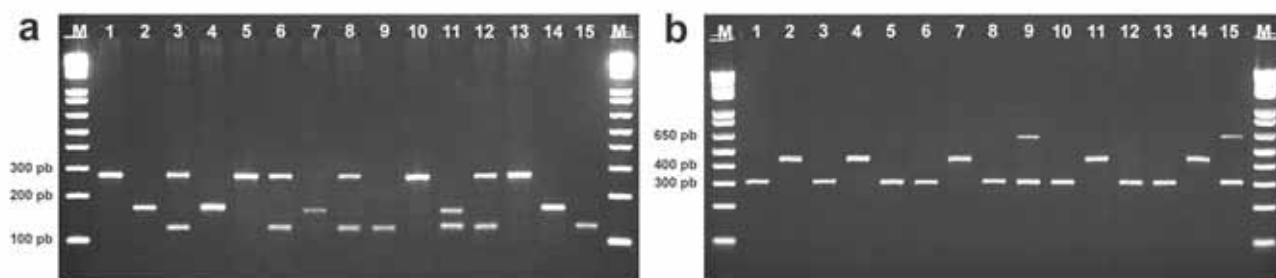


**Figura 32** - Padrões de identificação molecular do estoque de “Patinga” da Piscicultura **B**. (a) e (b) são resultados de PCR-Multiplex dos genes nuclear TROP e mitocondrial COI, respectivamente. Em (a), colunas **1, 5 e 10** revelando o padrão de *P. mesopotamicus*; **2, 4 e 7** de *C. macropomum*; **9** de *P. brachypomus*; **3, 6, 8 e 12** de “Patinga”; **11** de “Tambatinga”. Em (b), colunas **2, 4, 7 e 11** mostram o padrão de *C. macropomum*; **1, 3, 5, 6, 8, 10 e 12** de *P. mesopotamicus*; **9** de *P. brachypomus*. Colunas **13, 14 e 15** são amostras de DNA das espécies puras *P. mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; **M**, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Após as análises de PCR-Multiplex, os mesmos resultados foram obtidos através da aplicação do método de PCR-RFLP utilizando os genes nuclear RAG2 e mitocondrial CYTB. Na maioria dos lotes comprados de diferentes pisciculturas, foi confirmada a ocorrência somente de indivíduos híbridos “Tambacu”, mesmo em estoques comercializados como espécies puras ou rotulados como outra linhagem híbrida (Figura 33). Em especial, uma grande mistura de distintas linhagens, incluindo combinações entre espécies puras e linhagens híbridas, foi observada nos lotes da Piscicultura **B**, que está especificado na Figura 34. É importante notar que a aplicação de dois diferentes *loci* nucleares e mitocondriais reforça a confiabilidade das análises.

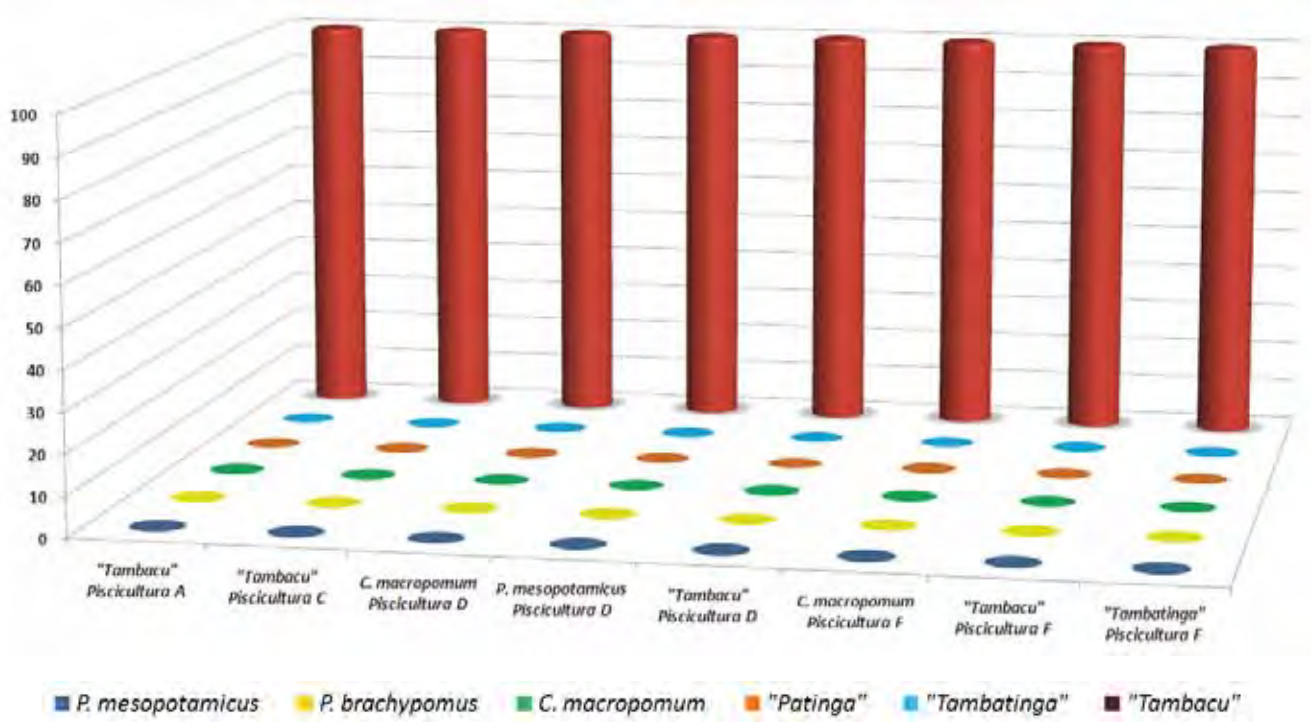


**Figura 33** - Resultados da identificação molecular dos lotes das Pisciculturas A, C, D e F. Em todos os estoques destas Pisciculturas foi detectada somente a presença de indivíduos da linhagem híbrida “Tambacu”.

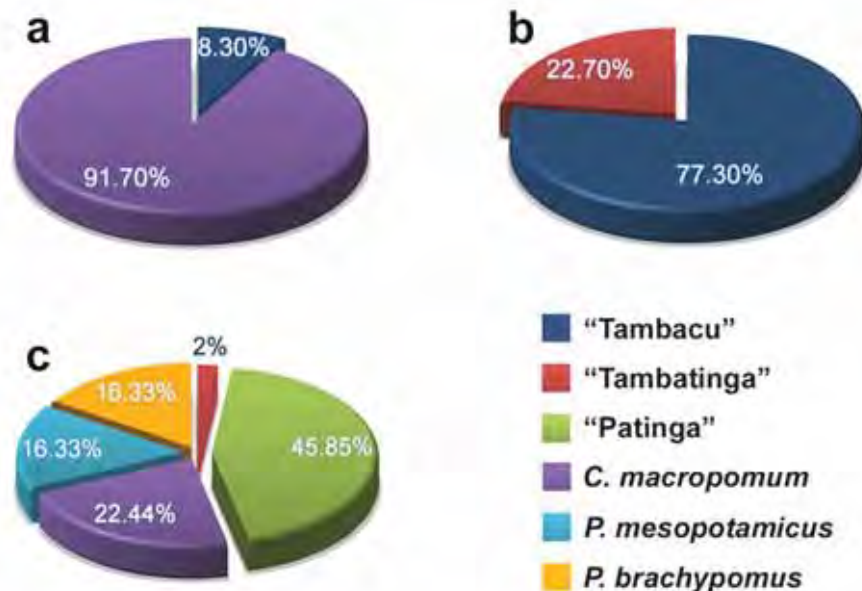


**Figura 34** - Resultados da identificação molecular. (a), (b) e (c) são os lotes de *Colossoma macropomum*, “Tambacu” e “Patinga”, respectivamente, da Piscicultura B. Em todos os lotes desta Piscicultura ocorreu uma grande mistura de linhagens, especialmente de híbridos.

### 3.2.3 Identificação de híbridos pós-F1 em lotes de peixes serrasalmídeos

No estoque de “Patinga” da Piscicultura **A**, com os resultados das análises de identificação molecular, considera-se que os juvenis deste lote provavelmente sejam linhagens pós-F1, resultante do retrocruzamento de uma fêmea híbrida de “Patinga” com um macho da espécie pura *C. macropomum*, uma vez que os marcadores nucleares (TROP e RAG2) e mitocondriais (COI e CYTB) evidenciaram genótipos atípicos e de diferentes composições no mesmo lote (Figura 35 e Tabela 10):

- **Genótipo A:** padrão de híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* para ambos os marcadores nucleares (TROP e RAG2), e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais;
- **Genótipo B:** genótipo de híbridos entre *C. macropomum* e *P. brachypomus* para ambos os marcadores nucleares (TROP e RAG2) e, interessante, genótipo de *P. mesopotamicus* com a aplicação dos marcadores mitocondriais. Este genótipo pode ocorrer através do retrocruzamento de uma fêmea de “Patinga” (fêmea de *P. mesopotamicus* x macho de *P. brachypomus*) com macho de *C. macropomum*;
- **Genótipo C:** padrões distintos entre os marcadores nucleares, ou seja, de híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* para o gene TROP, e de híbridos entre *C. macropomum* e *P. brachypomus* para o gene RAG2; e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais. Estes resultados são comuns de cruzamentos envolvendo um híbrido, neste caso a “Patinga”, pois a prole pode herdar tanto o DNA de uma espécie (*P. mesopotamicus*) quanto o DNA da outra espécie (*P. brachypomus*).
- **Genótipo D:** diferentes padrões entre os marcadores nucleares e com uma composição inversa ao genótipo C, ou seja, de híbridos entre *C. macropomum* e *P. brachypomus* para o gene TROP, e de híbridos entre *C. macropomum* e *P.*

*mesopotamicus* para o gene RAG2; e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais. Da mesma forma que o genótipo C, os resultados são típicos de cruzamentos envolvendo um híbrido.

- **Genótipo E:** um genótipo atípico com padrão de três bandas do gene TROP, revelando fragmentos gênicos herdados das três espécies. Já para o gene RAG2, um padrão de híbridos entre *C. macropomum* e *P. mesopotamicus*; e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais. Tal situação é inusitada e pode ser entendida com os resultados citogenéticos demonstrados posteriormente.

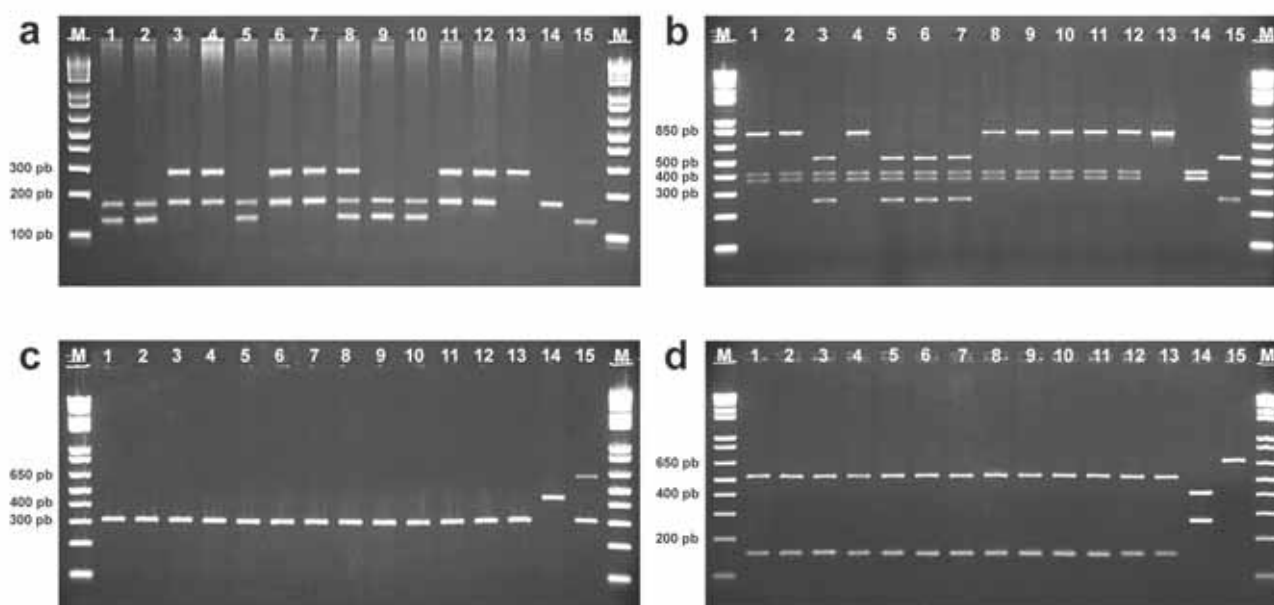


**Figura 35** – Padrões de identificação molecular do estoque de “Patinga” da Piscicultura A. (a) e (b) são géis dos genes nuclear TROP e RAG2, respectivamente. (c) e (d) são referentes às análises dos genes mitocondriais COI e CYTB, respectivamente. Colunas 4, 11 e 12 correspondem ao padrão de identificação do genótipo A; 5 do genótipo B; 3, 6 e 7 do genótipo C; 1, 2, 9 e 10 do genótipo D; 8 do genótipo E. Colunas 13, 14 e 15 são amostras de DNA das espécies puras *P. mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

De acordo com as leis mendelianas, com exceção do genótipo E, caso o cruzamento seja de um híbrido com uma espécie pura, a probabilidade esperada de

ocorrência de cada genótipo é de 25% (Figura 36). Nos resultados observados, oito exemplares foram do genótipo A (25%), nove do genótipo B (28.125%), seis do genótipo C (18.75%) e nove do genótipo D (28.125%). Não há diferença significativa entre os resultados observados e esperados ( $\chi^2$ ,  $p > 0.05$ ), o que torna viável a hipótese de um retrocruzamento entre híbrido “Patinga” com *C. macropomum*.

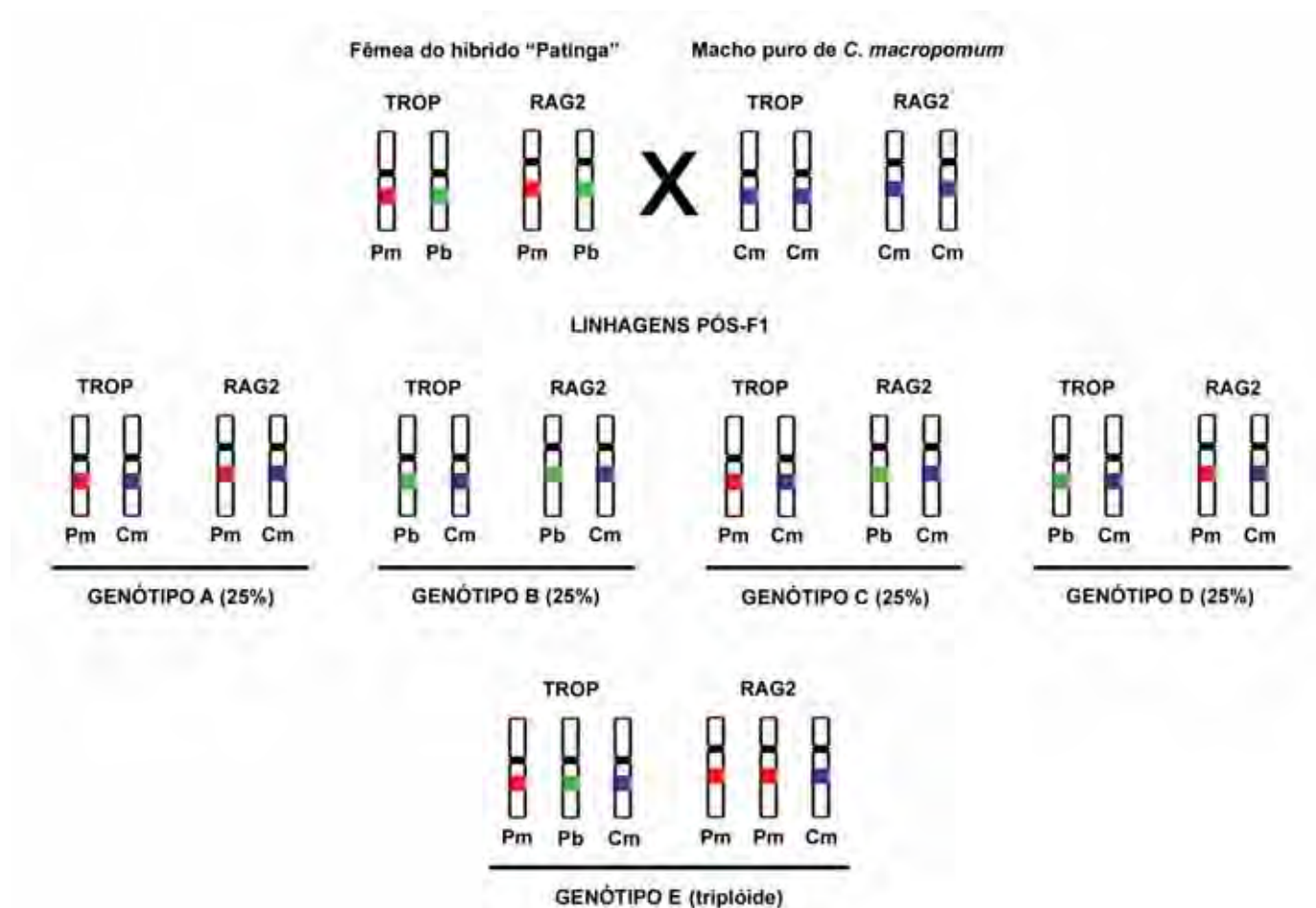


**Figura 36** – Representação esquemática dos loci gênicos TROP e RAG2 em um cruzamento entre “Patinga” e *Colossoma macropomum*, e a probabilidade esperada de ocorrência dos genótipos A, B, C e D. A sigla **Pm** significa *Piaractus mesopotamicus*, **Pb** corresponde a *P. brachypomus* e **Cm** equivale a *C. macropomum*.

**Tabela 10** – Relação dos indivíduos analisados do lote de “Patinga” da Piscicultura **A** e os respectivos genótipos de identificação molecular com os marcadores nucleares e mitocondriais. A sigla **Pm** significa *Piaractus mesopotamicus*, **Pb** corresponde a *P. brachypomus* e **Cm** equivale a *C. macropomum*.

| Identificação | Marcador mitocondrial |    |    | Marcador nuclear   |    |    |               |    |    | Genótipo |
|---------------|-----------------------|----|----|--------------------|----|----|---------------|----|----|----------|
|               | Pm                    | Cm | Pb | PCR-Multiplex TROP |    |    | PCR-RFLP RAG2 |    |    |          |
|               | Pm                    | Cm | Pb | Pm                 | Cm | Pb | Pm            | Cm | Pb |          |
| A242          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A243          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A244          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A245          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |
| A246          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | -             | x  | x  | C        |
| A247          | x                     | -  | -  |                    | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A248          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | -             | x  | x  | C        |
| A249          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | -             | x  | x  | C        |
| A250          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A251          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A252          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A253          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |
| A254          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | -             | x  | x  | C        |
| A255          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A256          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A257          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |
| A258          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A259          | x                     | -  | -  | x                  | x  | x  | x             | x  | -  | E        |
| A260          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A261          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |
| A262          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |
| A263          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A264          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | x             | x  | -  | D        |
| A265          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A266          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A267          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |
| A268          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A269          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A270          | x                     | -  | -  | -                  | x  | x  | -             | x  | x  | B        |
| A271          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |
| A272          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | -             | x  | x  | C        |
| A273          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | -             | x  | x  | C        |
| A274          | x                     | -  | -  | x                  | x  | -  | x             | x  | -  | A        |

Através dos estudos de caracterização cariotípica, observou-se que as metáfases dos exemplares deste estoque apresentaram um número cromossômico diplóide de 54 cromossomos, com morfologias dos tipos meta e submetacêntricos. Adicionalmente, os resultados citogenéticos demonstraram a ocorrência de um

indivíduo híbrido com cariótipo de  $3n=81$  cromossomos, o que indicou ser um poliplóide com três conjuntos cromossômicos (Figura 37).

Tal exemplar, identificado citogeneticamente como híbrido triplóide, corresponde ao único indivíduo do genótipo E, que revelou os fragmentos do gene TROP herdados de ambas as espécies *P. mesopotamicus*, *P. brachypomus* e *C. macropomum*. Este fato pode ser explicado devido à ocorrência de dois fenômenos: durante a gametogênese na fêmea da “Patinga”, um evento de *crossing-over* envolvendo regiões do gene TROP, entre os cromossomos de *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus* presentes na “Patinga”; em seguida, pelo fenômeno de retenção do segundo corpúsculo polar no óvulo, que determina a triploidia e mantém as duas cromátides, cada uma contendo o gene de uma das espécies, do cromossomo que sofreu *crossing-over*. Em relação ao genótipo do gene RAG2, provavelmente não ocorreu o evento de *crossing-over* envolvendo regiões deste gene e, por isso, foi herdado somente o segmento gênico de uma das espécies, no caso de *P. mesopotamicus*.

Por meio da aplicação da técnica de hibridação fluorescente *in situ*, a localização de clusters do DNA ribossomal (DNAr) 5S no genoma dos exemplares deste lote foi observada na região pericentromérica de quatro cromossomos, que aparentemente não são homólogos, sendo que em dois cromossomos as marcações estavam localizadas no braço longo (sinais mais evidentes), enquanto que nos outros dois os clusters de 5S foram evidenciados no braço curto (marcações fracas). Já no exemplar identificado previamente como triplóide, foram observados seis marcações de DNAr 5S, sendo três cromossomos com sinais na região pericentromérica do braço longo (sinais mais evidentes) e três localizados no braço curto (marcações fracas), ratificando a poliploidia (Figura 37).

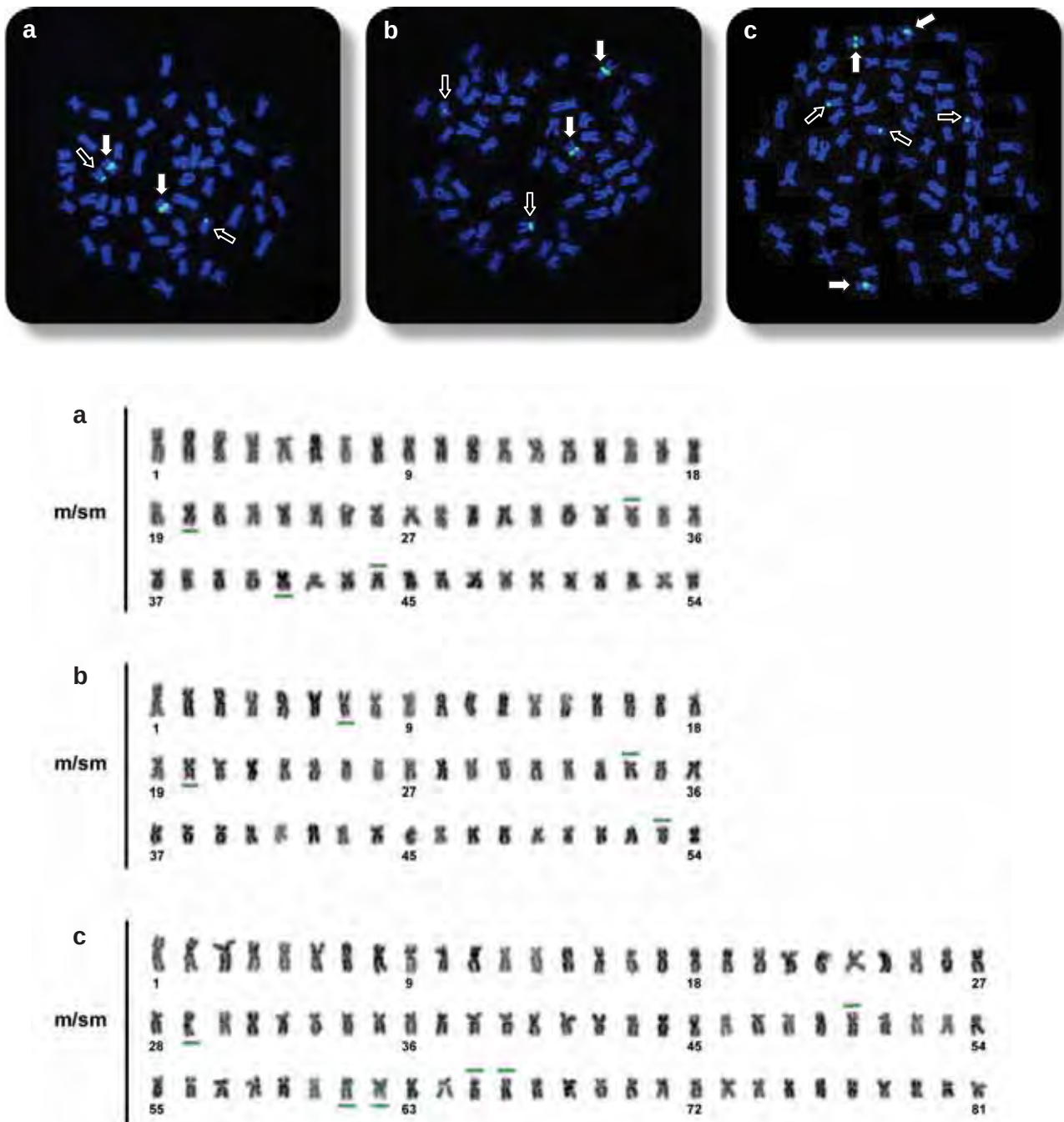


**Figura 37** – Acima, metáfases de indivíduos do estoque de “Patinga” da Piscicultura **A**, que através de FISH, estão evidenciando os clusters de DNAr 5S nos cromossomos; setas preenchidas indicam sinais DNAr 5S no braço longo e setas sem preenchimento no braço curto dos cromossomos. Abaixo, os respectivos cariótipos (DAPI invertido) das metáfases, com destaque para barras verdes evidenciando os cromossomos portadores de DNAr 5S e a respectiva localização (braço longo ou curto). **(a)** é referente a um exemplar do genótipo A da identificação molecular, **(b)** do genótipo B e **(c)** do genótipo E.

Apesar da constatação de que não são cromossomos homólogos, revelado por diferenças de tamanho e/ou morfologia, não foi possível distinguir qual cromossomo portador de DNAr 5S é proveniente de cada espécie parental, uma vez que os níveis de condensação podem interferir na classificação do tamanho dos cromossomos. Entretanto, é nítida a presença de várias combinações destes cromossomos nos indivíduos analisados, sendo mais uma evidência de que estes exemplares foram resultantes de linhagens pós-F1, a partir de um retrocruzamento da “Patinga” com a espécie *C. macropomum*. As hibridações foram realizadas com intuito de englobar todos os genótipos mostrados acima pela identificação molecular, no entanto, não foi possível correlacionar os diferentes cromossomos portando cluster de 5S com os padrões dos marcadores gênicos TROP e RAG2.

Em consideração ao lote de “Patinga” da Piscicultura **E**, os resultados da identificação molecular também revelaram a ocorrência de híbridos de linhagens pós-F1, evidenciado por diferentes genótipos que corroboram esta hipótese. O retrocruzamento que resultou em produtos híbridos pós-F1 provavelmente envolveu uma fêmea híbrida de “Patinga” com um macho da espécie pura *P. brachypomus*, que podem ser diagnosticados através dos marcadores nucleares (TROP e RAG2) e mitocondriais (COI e CYTB) devido aos seguintes genótipos (Figura 38 e Tabela 11):

- **Genótipo F:** padrão de híbridos entre *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus* para ambos os marcadores nucleares (TROP e RAG2), e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais;
- **Genótipo G:** genótipo da espécie pura *P. brachypomus* para ambos os genes nucleares (TROP e RAG2), e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais, fato que só pode ocorrer cruzando uma fêmea de “Patinga” (fêmea de *P. mesopotamicus* x macho de *P. brachypomus*) com macho de *P. brachypomus*;

- **Genótipo H:** padrões distintos entre os marcadores nucleares, ou seja, de híbridos entre *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus* para o gene TROP, e da espécie pura *P. brachypomus* para o gene RAG2; e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais. Estes resultados são comuns em cruzamentos com um híbrido, neste caso a “Patinga”, pois podem herdar tanto o DNA de uma espécie (por exemplo, *P. mesopotamicus*) quanto da outra espécie (por exemplo, *P. brachypomus*);
- **Genótipo I:** diferentes padrões entre os marcadores nucleares e com uma composição inversa ao genótipo H, ou seja, de espécie pura *P. brachypomus* para o gene TROP, e de híbridos entre *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus* para o gene RAG2; e genótipo de *P. mesopotamicus* para os genes mitocondriais. Da mesma forma que o genótipo H, estes resultados são típicos de linhagens pós-F1.

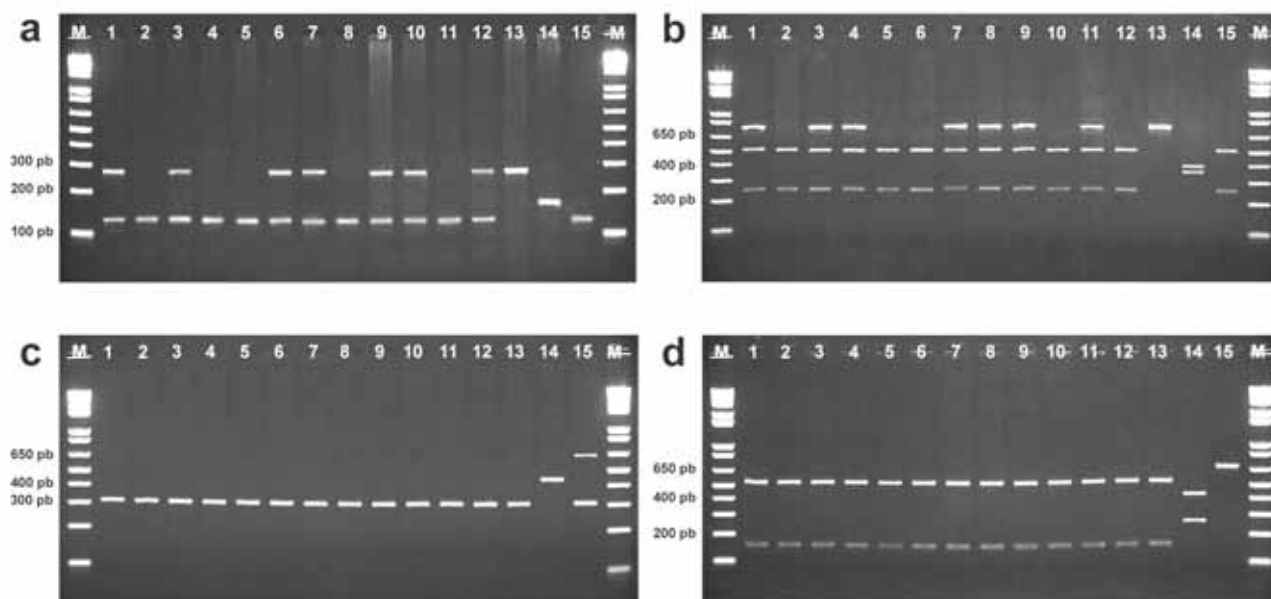


**Figura 38** – Padrões de identificação molecular do estoque de “Patinga” da Piscicultura E. (a) e (b) são resultados dos genes nucleares TROP e RAG2, respectivamente. (c) e (d) são referentes às análises dos genes mitocondriais COI e CYTB, respectivamente. Colunas 1, 3, 7 e 9 correspondem ao padrão de identificação do genótipo F; 2 e 5 do genótipo G; 6, 10 e 12 do genótipo H; 4, 8 e 11 do genótipo I. Colunas 13, 14 e 15 são amostras de DNA das espécies puras *P. mesopotamicus*, *C. macropomum* e *P. brachypomus*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Da mesma que no lote de “Patinga” da Piscicultura **A**, conforme as leis mendelianas, caso o cruzamento seja de um híbrido com uma espécie pura, a probabilidade esperada de ocorrência de cada um dos genótipos é de 25%, como demonstrado na Figura 39. Nos resultados observados deste lote, dez indivíduos foram do genótipo **F** (22.72%), 11 do genótipo **G** (25%), 11 do genótipo **H** (25%) e 12 do genótipo **I** (27.28%). Não há diferença significativa entre os resultados observados e esperados ( $\chi^2$ ,  $p > 0.05$ ), o que permite aceitar a hipótese de um cruzamento entre híbrido “Patinga” com a espécie *P. brachypomus*.

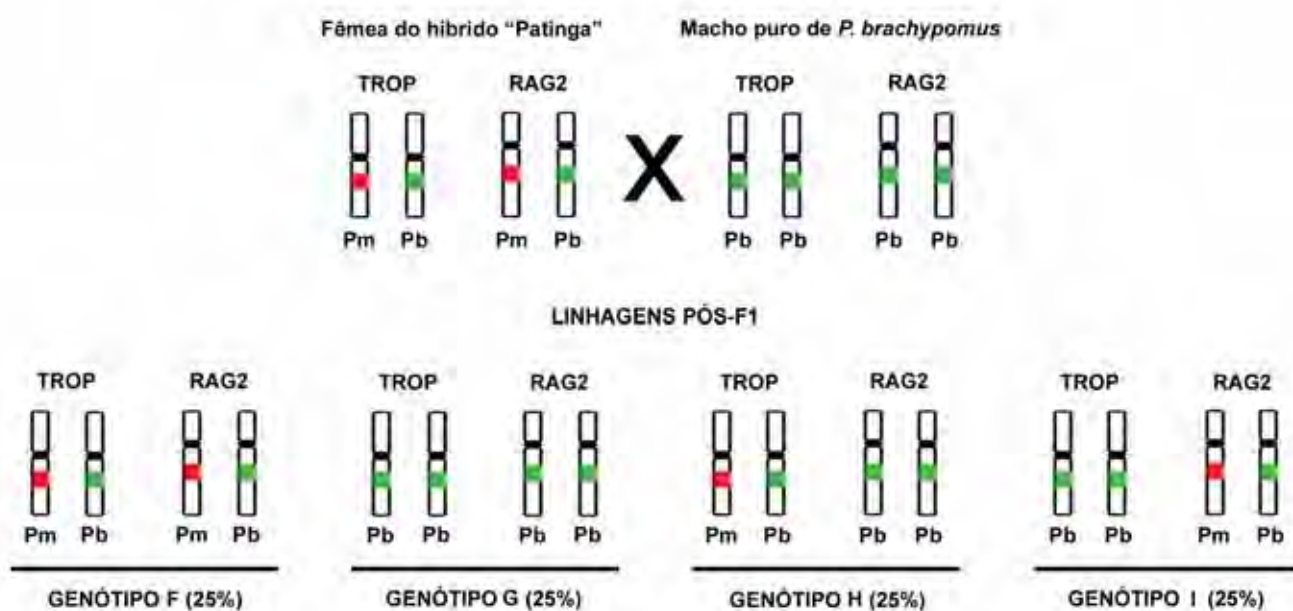


**Figura 39** – Representação esquemática dos *loci* gênicos TROP e RAG2 em um cruzamento entre “Patinga” e *Piaractus brachypomus*, e a probabilidade esperada de ocorrência dos genótipos F, G, H e I. A sigla **Pm** significa *Piaractus mesopotamicus* e **Pb** corresponde a *P. brachypomus*.

**Tabela 11** – Relação dos indivíduos analisados do lote de “Patinga” da Piscicultura **E** e os respectivos genótipos de identificação molecular com os marcadores nucleares e mitocondriais. A sigla **Pm** significa *Piaractus mesopotamicus*, **Pb** corresponde a *P. brachypomus* e **Cm** equivale a *C. macropomum*.

| Identificação | Marcador mitocondrial |    |    | Marcador nuclear   |    |    |               |    |    | Genótipo |
|---------------|-----------------------|----|----|--------------------|----|----|---------------|----|----|----------|
|               |                       |    |    | PCR-Multiplex TROP |    |    | PCR-RFLP RAG2 |    |    |          |
|               | Pm                    | Cm | Pb | Pm                 | Cm | Pb | Pm            | Cm | Pb |          |
| E151          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E152          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E153          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E154          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E155          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E156          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | A        |
| E157          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E158          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E159          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E160          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E161          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E162          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E163          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E164          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E165          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E166          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E167          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E168          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E169          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E170          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E171          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E172          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E173          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E174          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E175          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E176          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E177          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E178          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E179          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E180          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E181          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E182          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |
| E183          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E184          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E185          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E186          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E187          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E188          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E189          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E190          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E191          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | x             | -  | x  | I        |
| E192          | x                     | -  | -  | -                  | -  | x  | -             | -  | x  | G        |
| E193          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | -             | -  | x  | H        |
| E194          | x                     | -  | -  | x                  | -  | x  | x             | -  | x  | F        |

### 3.3.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. reticulatum*

Para as espécies parentais *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* foram sequenciados os genes mitocondrial 16S e nuclear RAG2 (*Recombination Activating Gene 2*). Os resultados obtidos pelo sequenciamento permitiram a análise de 612 pb do gene 16S (5 sítios polimórficos) e 521 pb do gene RAG2 (3 sítios polimórficos), com uma divergência genética de 0.008 e 0.006, respectivamente. Estas sequências apresentaram uma divergência genética suficiente para a distinção das duas espécies, possibilitando a análise dos mapas de restrição e posicionamento de primers espécie-específicos.

#### PCR-RFLP

Os mapas de restrição gerados para as sequências dos genes 16S e RAG2 possibilitaram identificar algumas enzimas com clivagem de corte único e espécies-específicas para serem utilizadas na diferenciação destas espécies. Foram selecionadas as enzimas SmaI, com clivagem exclusiva no fragmento gênico mitocondrial 16S de *P. reticulatum*, e Sau96I, com sítio de restrição no gene nuclear RAG2 apenas da espécie *P. corruscans*, como mostrados nos mapas de restrição das Figuras 40 e 41.

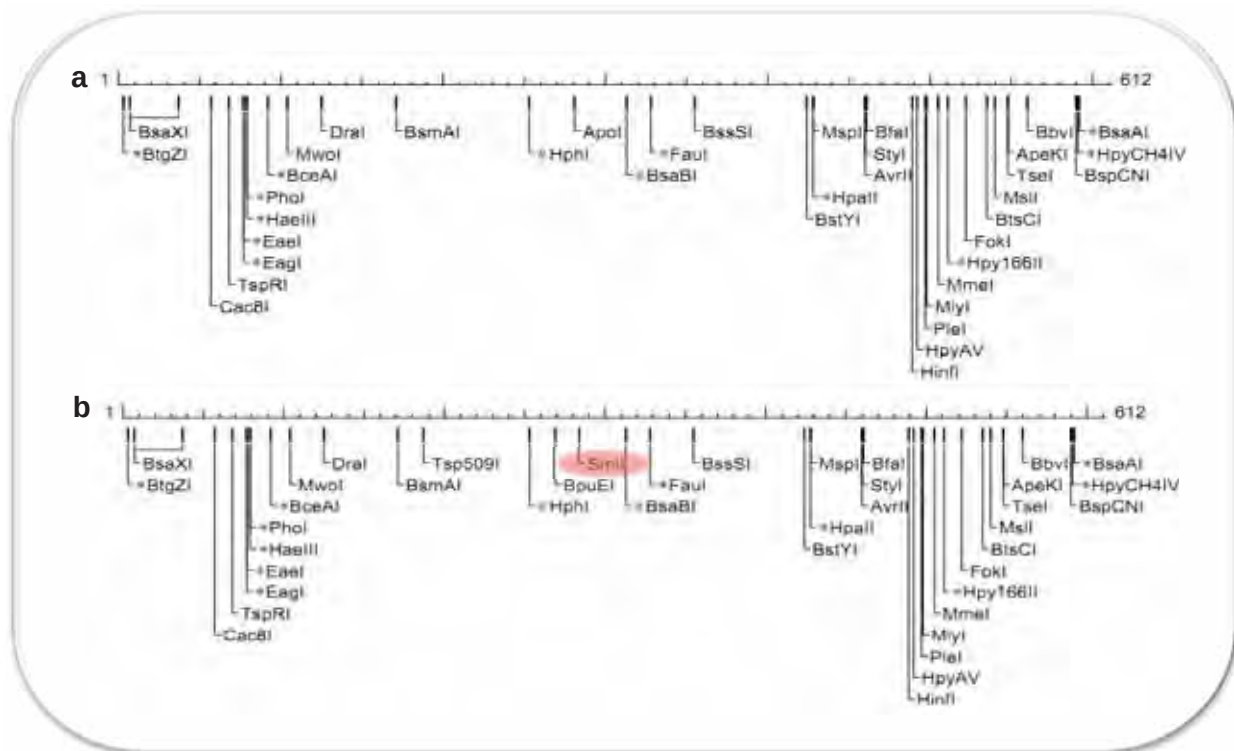


**Figura 40** - Mapas de restrição do gene mitocondrial 16S da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b). Em destaque a enzima *SmaI*, com sítio de restrição apenas em *P. reticulatum*.

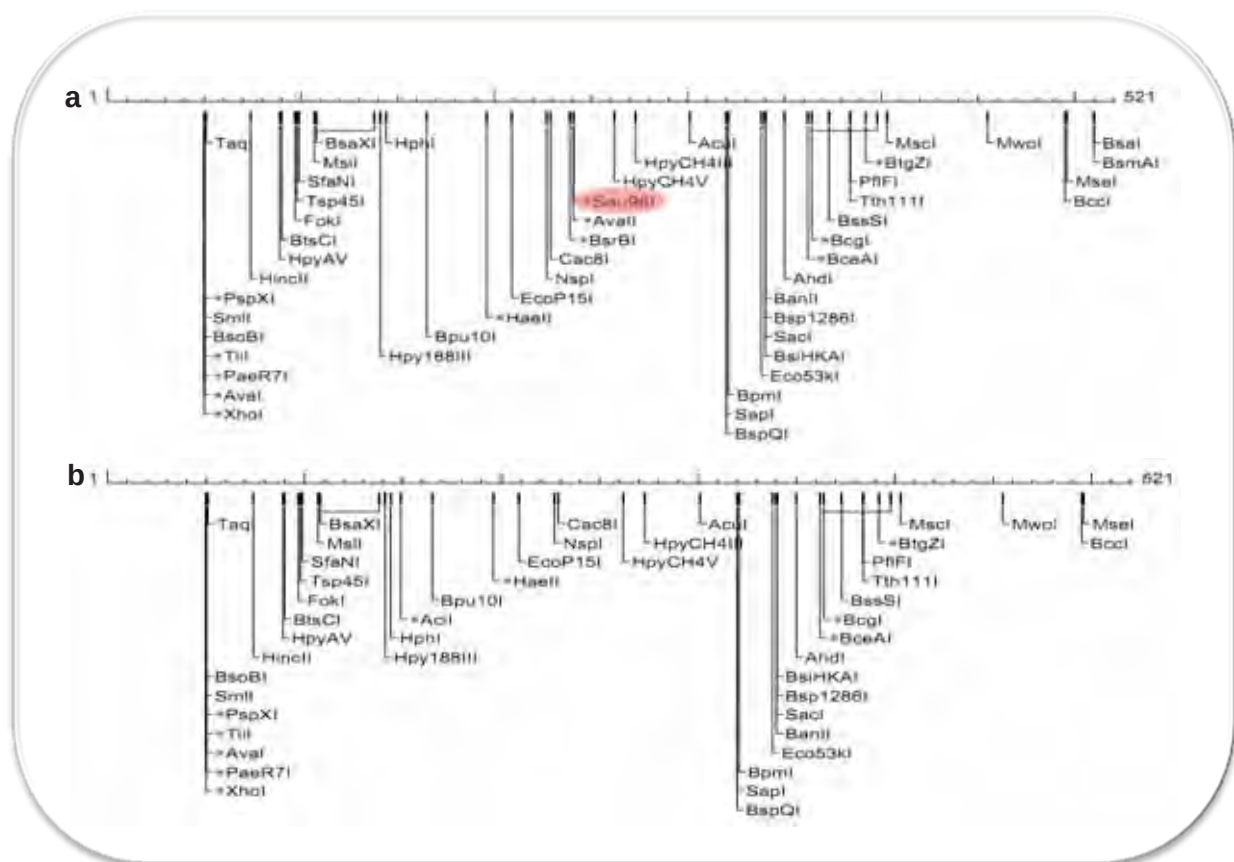


**Figura 41** - Mapas de restrição do gene nuclear RAG2 da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b). Em destaque a enzima *Sau96I*, com sítio de restrição apenas em *P. corruscans*.

A amplificação do gene mitocondrial 16S (primers 16S F e 16S R) e posterior digestão pela enzima SmlI revelou diferenças entre os padrões eletroforéticos das linhagens parentais. As amostras de *P. corruscans* mantiveram um único alelo de amplificação de 612 pb. Já os exemplares de *P. reticulatum* apresentaram dois marcadores, com cerca de 285 pb e 327 pb, resultantes da restrição enzimática. As amostras do híbrido “Pintachara” revelaram o mesmo perfil de eletroforese observado no parental materno *P. corruscans*, enquanto o híbrido “Cachapinta” mostrou o mesmo padrão do parental materno *P. reticulatum* (Figura 42).

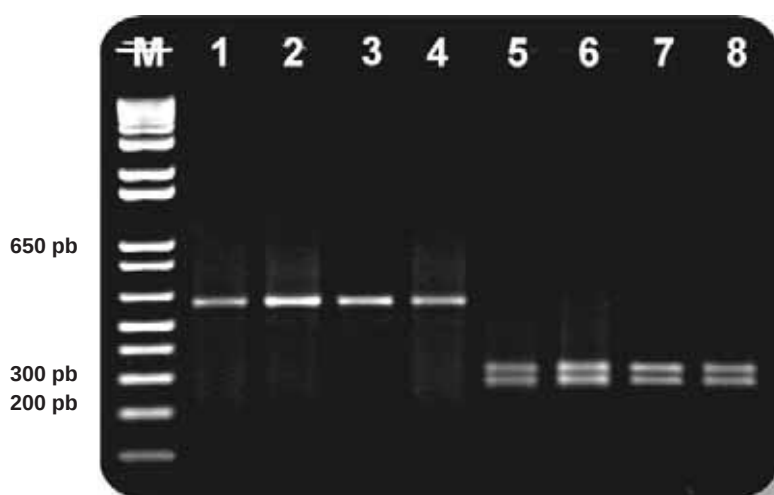


**Figura 42** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene 16S. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintachara” (3-4), “Cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

A amplificação do gene nuclear RAG2 (primers RAG2 SiluF e RAG2 SiluR) submetida à clivagem pela enzima Sau96I mostrou que as amostras de *P. corruscans* apresentaram duas bandas, com aproximadamente 242 pb e 279 pb, resultantes da ação enzimática. Já os indivíduos de *P. reticulatum* mantiveram seu perfil de eletroforese contendo uma única banda de 521 pb, sem cortes. Nos híbridos observaram-se três bandas (242 pb, 279 pb e 521 pb), sendo duas herdadas do genoma de *P. corruscans* e uma de *P. reticulatum* (Figura 43).

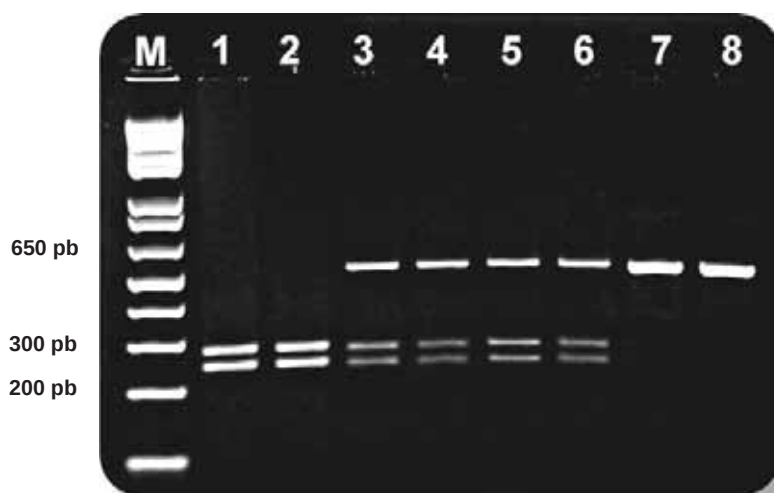


**Figura 43** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene RAG2. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintachara” (3-4), “Cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### PCR-Multiplex

Para as sequências do gene mitocondrial 16S, foram desenhados primers em sentidos opostos, cada um envolvendo uma mutação, sendo o primer *16S PcF* (Forward) específico para *P. corruscans* e *16S PrR* (Reverse) específico para *P. reticulatum* (Tabela 12). Em relação ao gene nuclear RAG2, cada um dos primers também foram posicionados em uma mutação, porém em locais distintos no sentido Reverse, sendo o primer *RAG2 PcR* (específico para *P. corruscans*) e *RAG2 PrR* (específico para *P. reticulatum*) (Tabela 12).

**Tabela 12** - Primers espécie-específicos para amplificação dos genes mitocondrial 16S e nuclear RAG2.

| Primers         | Sequências dos primers           |
|-----------------|----------------------------------|
| <i>16S PcF</i>  | 5'- TGACCATAAAGATCCGGCTAT -3'    |
| <i>16S PrR</i>  | 5'- TCTTGGTTTTGGGGTTGTTA -3'     |
| <i>RAG2 PcR</i> | 5'- AACTCCAGGTCAATGAGATAAATG -3' |
| <i>RAG2 PrR</i> | 5'- GACAGTCCACCATGCAGTTCCAGG -3' |

Assim, os resultados das reações Multiplex do gene 16S (16S F, 16S R, 16S PcF e 16S PrR) demonstraram distintos genótipos entre as espécies parentais. Todas as amostras tiveram uma banda de 612 pb, como controle da reação. Adicionalmente, os indivíduos de *P. corruscans* mostraram um marcador com 197 pb, enquanto que os exemplares de *P. reticulatum* apresentaram um alelo de 388 pb (Figuras 44 e 45). Nas amostras do híbrido “Pintachara” foram reveladas o mesmo padrão do parental materno *P. corruscans*, enquanto o híbrido “Cachapinta” apresentou os mesmos marcadores do parental materno *P. reticulatum* (Figura 45).

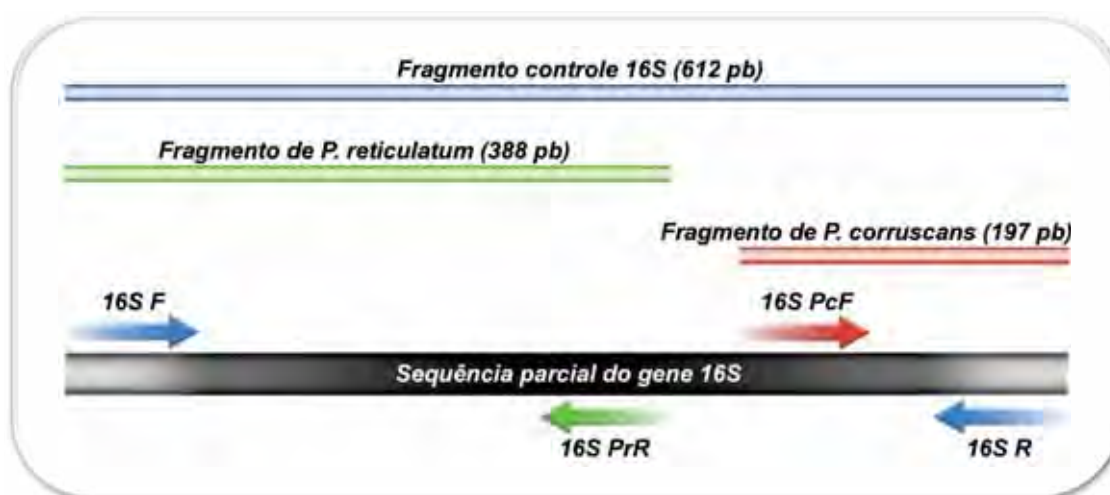


**Figura 44** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene mitocondrial 16S.

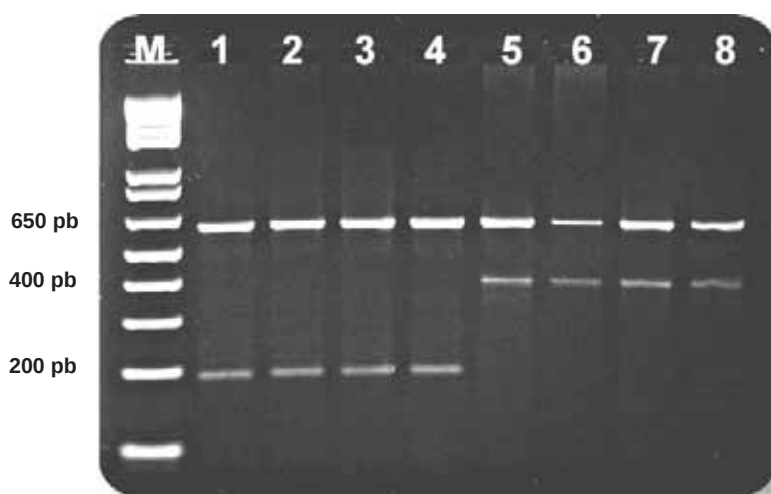


**Figura 45** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene 16S. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintachara” (3-4), “Cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Amplificações do DNA nuclear RAG2 em reação Multiplex (*RAG2 SiluF*, *RAG2 SiluR*, *RAG2 PcR* e *RAG2 PrR*) demonstraram um fragmento de 521 pb, como controle da reação. Além disso, os indivíduos de *P. corruscans* apresentaram um fragmento de 308 pb, enquanto que os de *P. reticulatum* tiveram uma banda de 277 pb (Figuras 46 e 47). Já nas amostras das linhagens híbridas “Pintachara” e “Cachapinta”, observaram-se um padrão heterozigótico em relação aos parentais, com uma banda herdada de cada espécie parental (Figura 47).

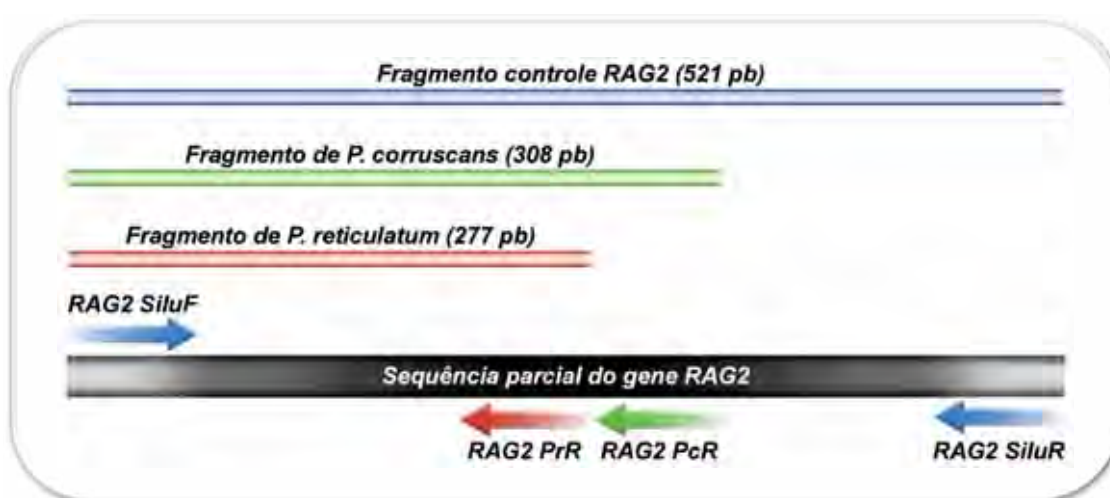


**Figura 46** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene nuclear RAG2.

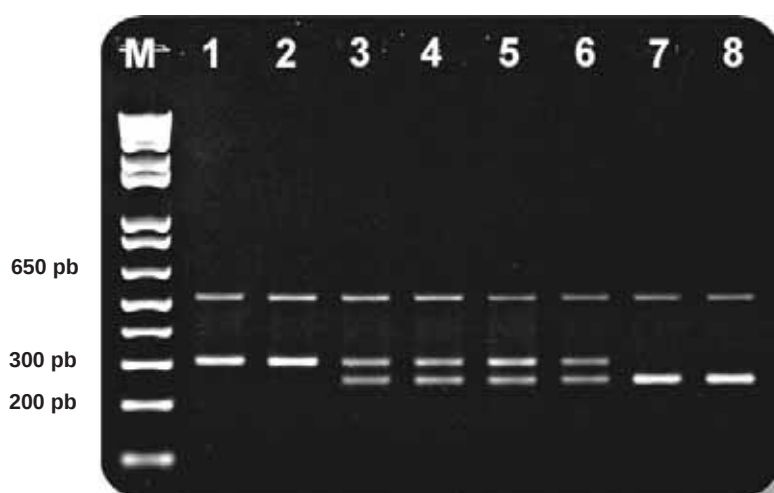


**Figura 47** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene RAG2. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintachara” (3-4), “Cachapinta” (5-6) e *P. reticulatum* (7-8). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.3.2 Marcadores moleculares na identificação de híbridos pós-F1 entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. reticulatum*

Tendo em vista a grande problemática envolvendo retrocruzamentos de híbridos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. reticulatum*, e como a aplicação de apenas um marcador nuclear não é suficiente para identificar linhagens pós-F1, as informações deste tópico foram organizadas para acrescentar novos marcadores nucleares na diferenciação destas espécies. Deste modo, foram obtidas sequências dos genes nucleares codificadores do Fator de Elongação 1-alfa (EF1 $\alpha$ ),  $\beta$ -globina (GLOB) e RNA Ribossomal 18S. Os resultados obtidos pelo sequenciamento possibilitaram a análise de 569 pb do gene GLOB (8 sítios polimórficos), 743 pb do gene EF1 $\alpha$  (4 sítios polimórficos) e 350 pb do gene 18S (2 sítios polimórficos), com uma divergência genética de 0.014, 0.005 e 0.006, respectivamente.

#### PCR-RFLP

As informações geradas pelos mapas de restrição possibilitaram localizar várias enzimas com cortes espécie-específicos. Em relação ao gene da  $\beta$ -globina, como padronização da metodologia, foi utilizada a enzima HpyAV, com digestão enzimática somente no segmento gênico da espécie *P. corruscans* (Figura 48). Para uma clivagem enzimática espécie-específica do gene EF1 $\alpha$ , foi aplicada a enzima Bpml, que apresenta apenas um sítio de clivagem no gene de *P. corruscans* e dois pontos de digestão no fragmento gênico da espécie *P. reticulatum* (Figura 49). Finalmente, para a diferenciação destas espécies através do gene 18S, foi selecionada a enzima SmaI, cujo sítio de restrição é restrito para o gene da espécie *P. corruscans* (Figura 50).

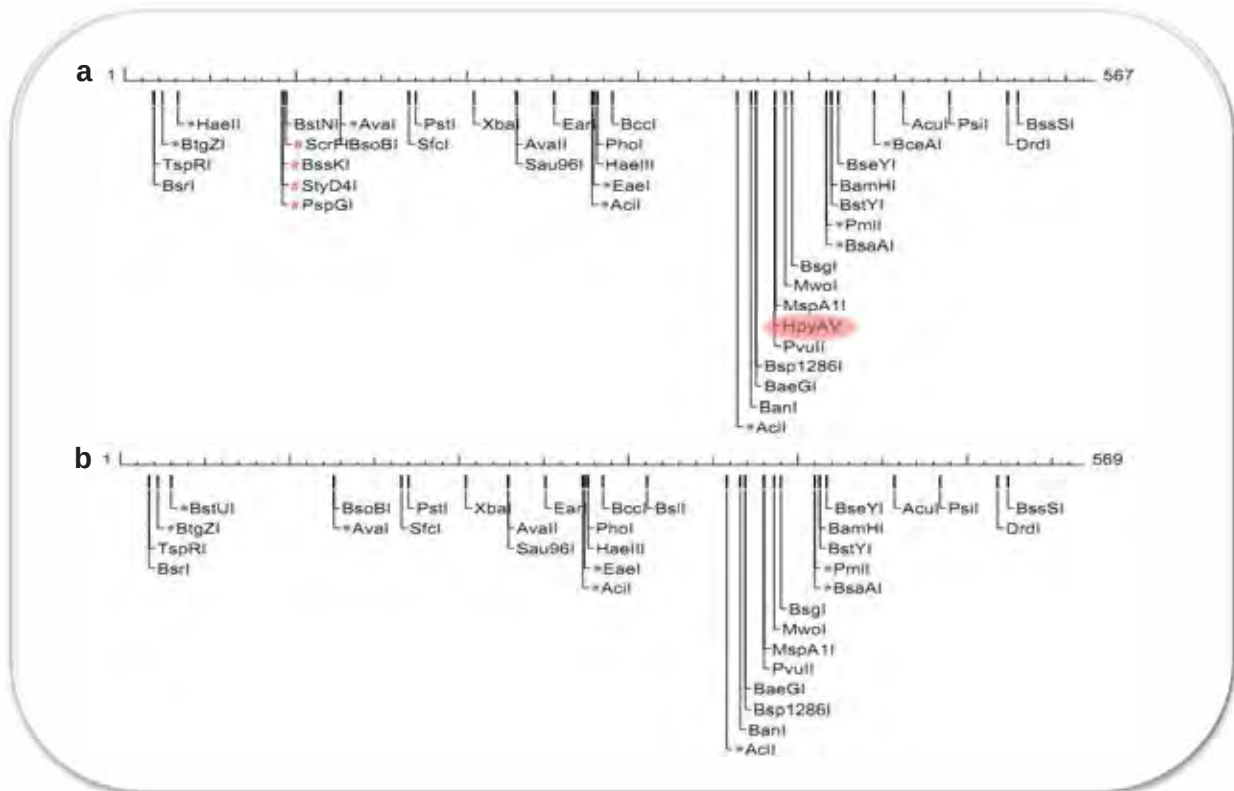


**Figura 48** - Mapas de restrição do gene nuclear GLOB da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b). Em destaque a enzima HpyAV, com sítio de restrição apenas em *P. corruscans*.

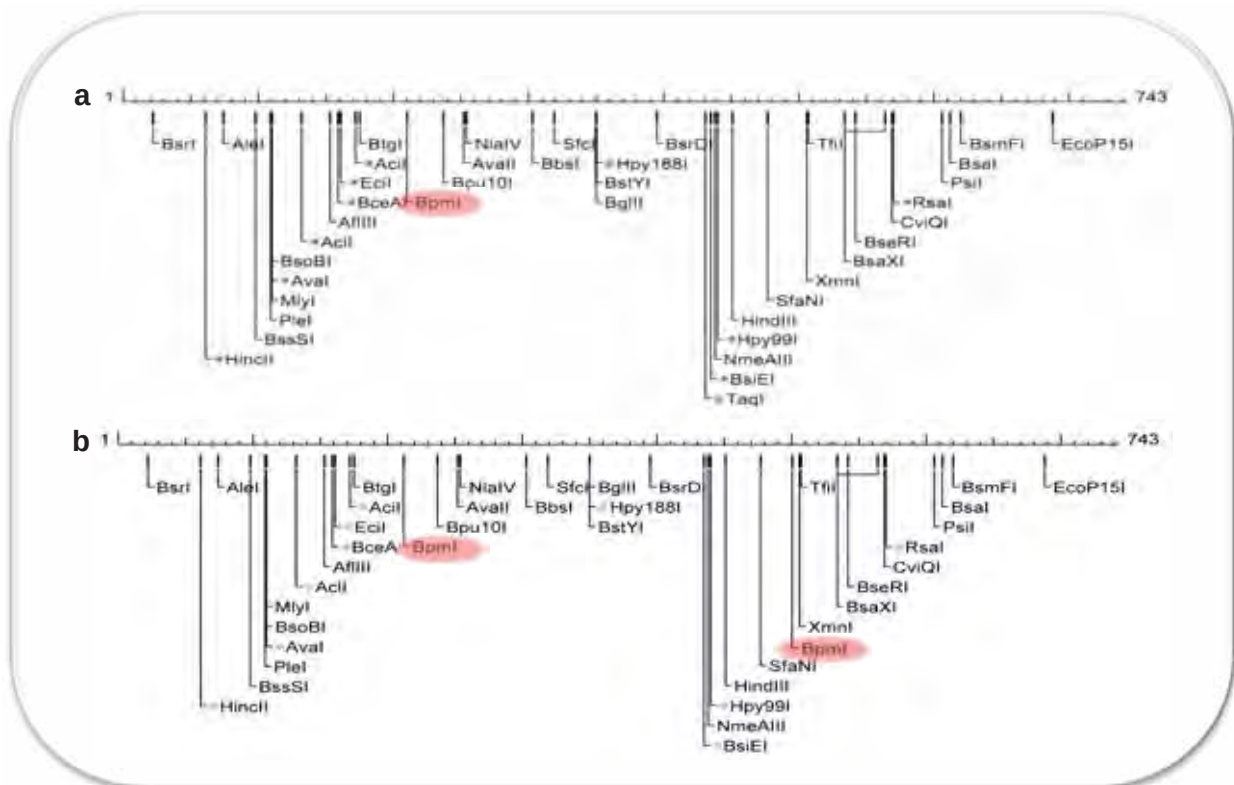


**Figura 49** - Mapas de restrição do gene nuclear EF1α da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b). Em destaque a enzima BpmI, com um sítio de restrição em *P. corruscans* e dois cortes em *P. reticulatum*

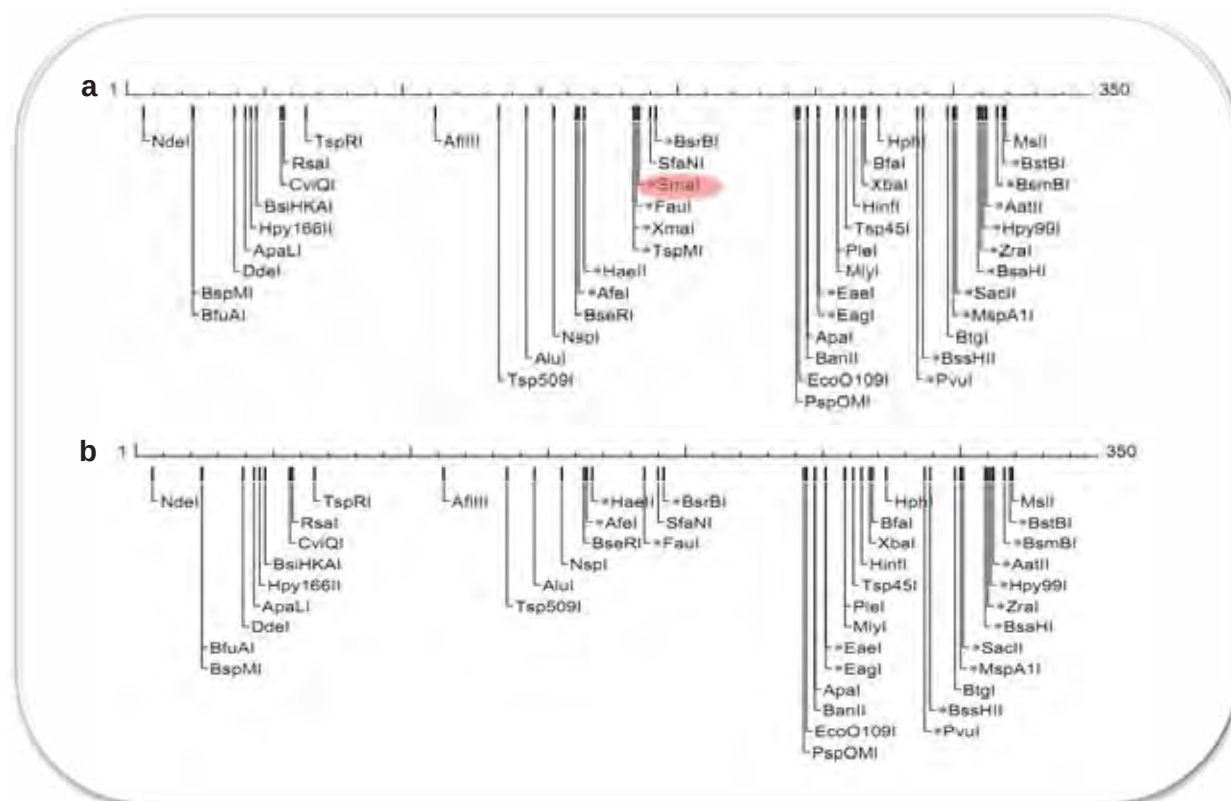


**Figura 50** - Mapas de restrição do gene nuclear 18S da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a) e *P. reticulatum* (b). Em destaque a enzima SmaI, com sítio de restrição apenas em *P. corruscans*.

A amplificação do gene nuclear  $\beta$ -globina (primers *GLOB SiluF* e *GLOB SiluR*) e posterior análise de RFLP com a enzima HpyAV revelou duas bandas para as amostras de *P. corruscans*, com aproximadamente 186 pb e 381 pb, que foram resultantes da digestão enzimática. Já os exemplares de *P. reticulatum* mantiveram o tamanho de fragmento inalterado, contendo uma única banda de 569 pb, pois não apresentavam sítio de clivagem da enzima HpyAV. Nos indivíduos das linhagens híbridas “Pintachara” e “Cachapinta” observaram-se três bandas, de 186 pb, 381 pb e 569 pb, sendo duas herdadas do genoma da espécie parental *P. corruscans* e uma de *P. reticulatum* (Figura 51).

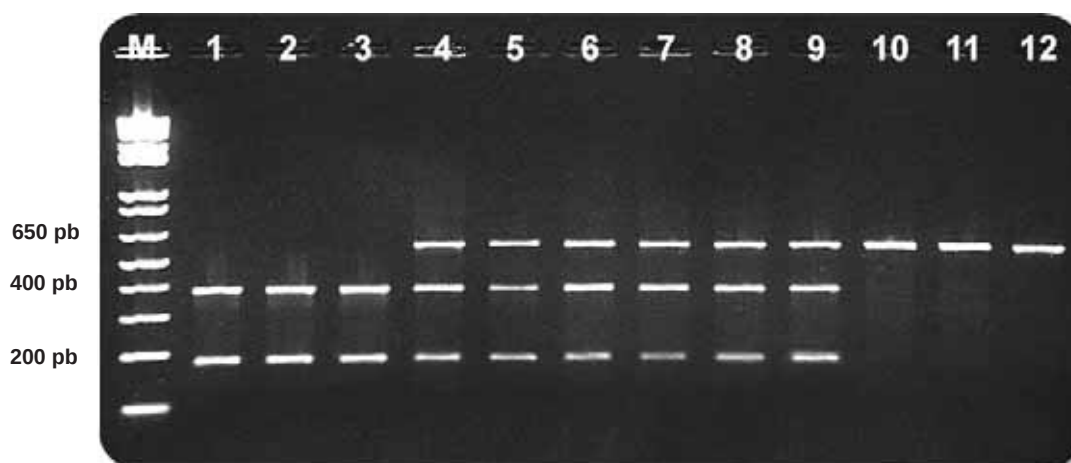


**Figura 51** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene GLOB. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-3), “Pintachara” (4-6), “Cachapinta” (7-9) e *P. reticulatum* (10-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

A amplificação do gene nuclear EF1 $\alpha$  (primers EF1 $\alpha$  F e EF1 $\alpha$  R) seguida pela restrição com a enzima BpmI exibiu duas bandas para os exemplares de *P. corruscans*, com cerca de 240 pb e 560 pb, devido à presença de apenas um sítio de clivagem neste fragmento gênico. Por outro lado, como os indivíduos de *P. reticulatum* revelaram dois pontos de restrição, o perfil de eletroforese foi evidenciado pela presença de três bandas, com aproximadamente 240 pb, 270 pb e 290 pb. Consequentemente, nos exemplares híbridos de “Pintachara” e “Cachapinta” observaram-se quatro marcadores (240 pb, 270 pb, 290 pb e 560 pb) (Figura 52).

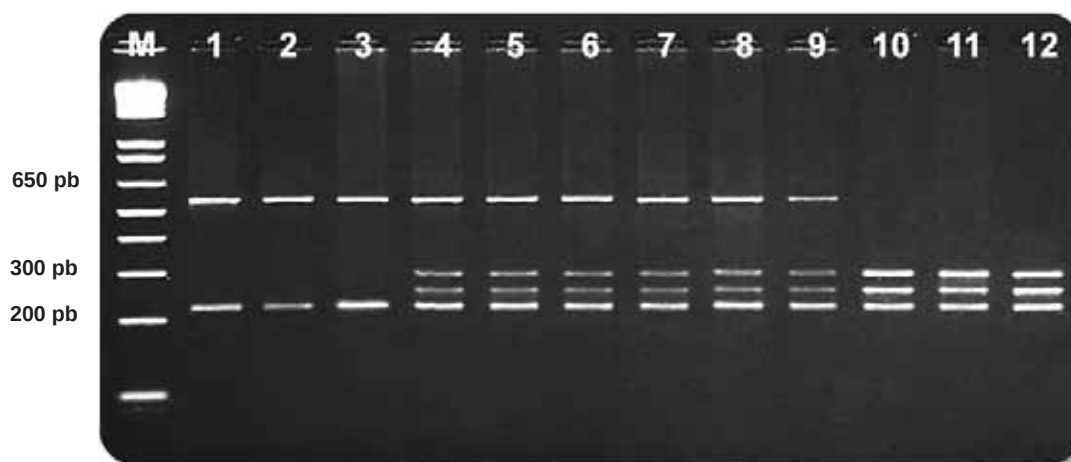


**Figura 52** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene EF1 $\alpha$ . *Pseudoplatystoma corruscans* (1-3), “Pintachara” (4-6), “Cachapinta” (7-9) e *P. reticulatum* (10-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

A análise de PCR-RFLP do gene nuclear 18S revelou para os indivíduos da espécie *P. corruscans* um perfil de duas bandas, de aproximadamente 163 pb e 187 pb, resultantes da restrição enzimática. As amostras de *P. reticulatum* permaneceram com uma única banda de amplificação de 350 pb, pois não exibiram sítio de clivagem da enzima. Já os indivíduos híbridos “Pintachara” e “Cachapinta” demonstraram três bandas, de 163 pb, 187 pb e 350 pb, sendo duas herdadas do genoma da espécie parental *P. corruscans* e uma de *P. reticulatum* (Figura 53).

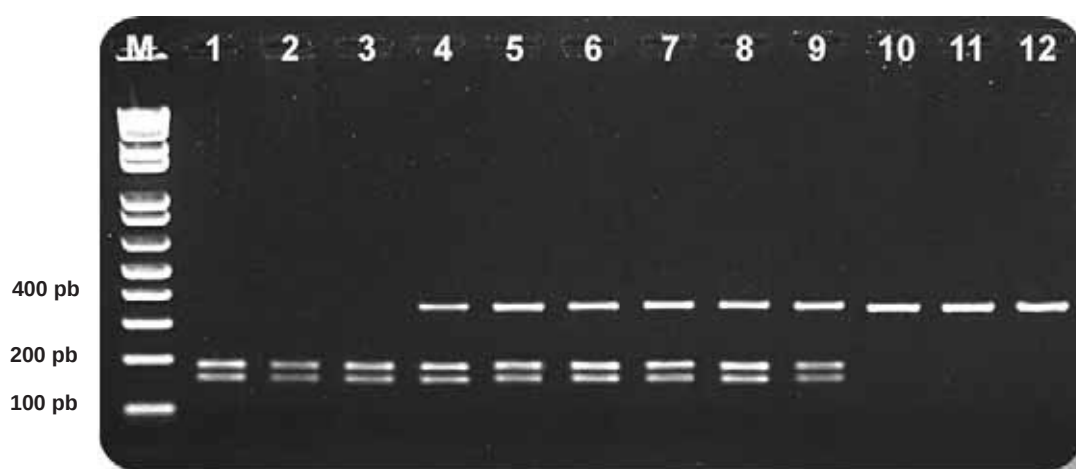


**Figura 53** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene 18S. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-3), “Pintachara” (4-6), “Cachapinta” (7-9) e *P. reticulatum* (10-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

#### PCR-Multiplex

Para o gene nuclear GLOB, os primers para cada espécie parental foram desenhados em sentidos opostos da sequência, sendo o primer *GLOB PcR* posicionado em duas mutações e específico para *P. corruscans*, e o primer *GLOB PrF* desenvolvido com base em três mutações e característico para *P. reticulatum* (Figura 13). Para o gene nuclear EF1 $\alpha$ , os primers foram desenhados em regiões distintas no sentido *Reverse*, cada um envolvendo uma mutação, sendo o primer *EF1 $\alpha$  PcR* exclusivo para *P. corruscans*, e o primer *EF1 $\alpha$  PrR* específico para *P.*

*reticulatum* (Tabela 13). Para o gene nuclear 18S não foram desenvolvidos primers espécie-específicos, pois além de revelarem uma baixa divergência genética e com apenas dois sítios polimórficos, os pontos de mutações que diferiram entre as sequências das duas espécies não foram considerados como regiões ideais para o posicionamento de primers.

**Tabela 13** - Primers espécie-específicos para amplificação de parte dos genes nucleares GLOB e EF1 $\alpha$ .

| Primers                           | Sequências dos primers             |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| <i>GLOB PcR</i>                   | 5'- CAGCCACCTTGGGGTTTCCT -3'       |
| <i>GLOB PrF</i>                   | 5'- GGTACGTCTAATCTCAGTAATTGAAA -3' |
| <i>EF1<math>\alpha</math> PcR</i> | 5'- CAACAATGGCAGCATCTCCT -3'       |
| <i>EF1<math>\alpha</math> PrR</i> | 5'- ATAAAGGACAAGGACAAGATCG -3'     |

Análises de amplificações do DNA nuclear  $\beta$ -globina em reação Multiplex (*GLOB SiluF*, *GLOB SiluR*, *GLOB PcR* e *GLOB PrF*) demonstraram em todas as amostras uma banda controle da reação de 569 pb. Especificamente, as amostras de *P. corruscans* demonstraram um alelo diagnóstico de 304 pb, enquanto que de *P. reticulatum* exibiram uma banda de 137 pb (Figuras 54 e 55). Em relação aos genótipos dos híbridos “Pintachara” e “Cachapinta”, observou-se um padrão de heterozigoto em relação aos parentais, com uma banda de 304 pb herdada da espécie *P. corruscans* e a outra de 137 pb proveniente de *P. reticulatum* (Figura 55).

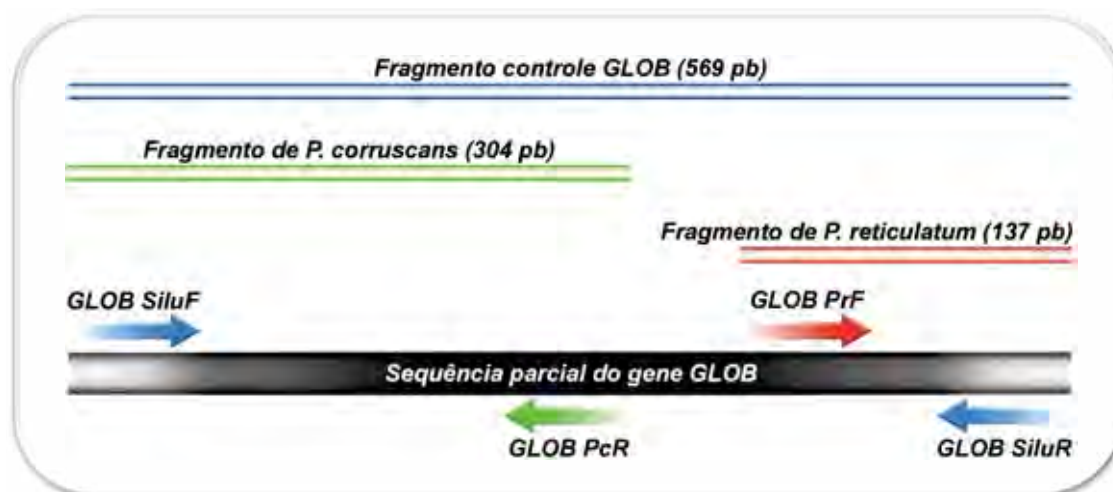


**Figura 54** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene nuclear GLOB.

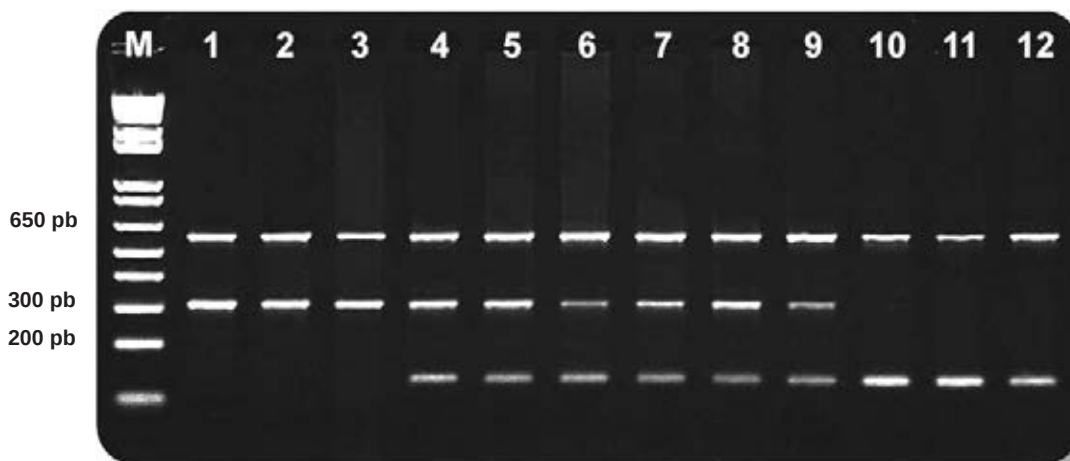


**Figura 55** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene GLOB. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-3), "Pintachara" (4-6), "Cachapinta" (7-9) e *P. reticulatum* (10-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Os resultados da reação Multiplex do gene EF1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$  F*, *EF1 $\alpha$  R*, *EF1 $\alpha$  PcR* e *EF1 $\alpha$  PrR*) evidenciaram em todos os exemplares um fragmento de amplificação com aproximadamente 800 pb, como controle da reação. Adicionalmente, os indivíduos de *P. corruscans* mostraram um fragmento com cerca de 520 pb, enquanto que as amostras de *P. reticulatum* revelaram um marcador de aproximadamente 630 pb (Figuras 56 e 57). Em relação aos híbridos "Pintachara" e

“Cachapinta”, observou-se a presença de dois marcadores diagnósticos, cada um herdado de uma espécie parental (Figura 57).

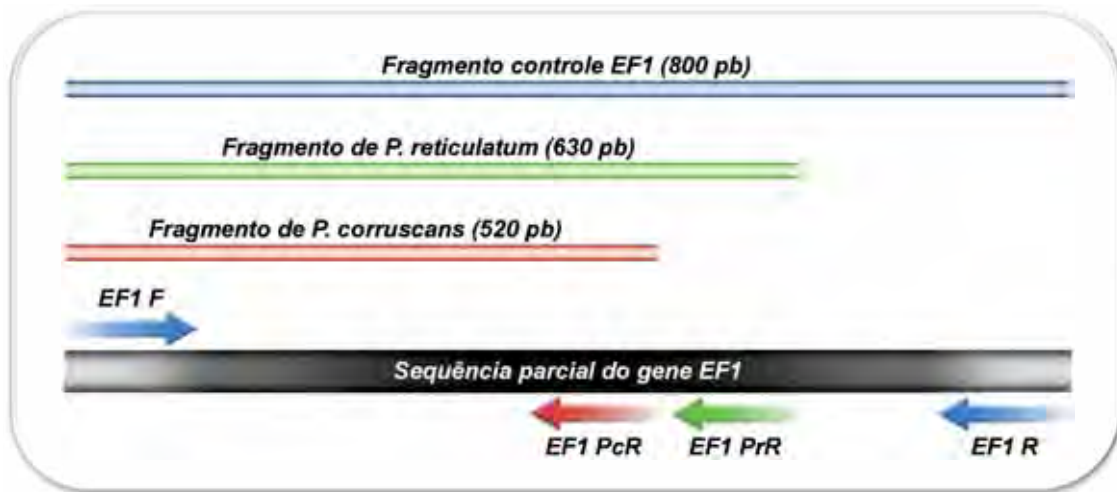


**Figura 56** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene nuclear EF1 $\alpha$ .

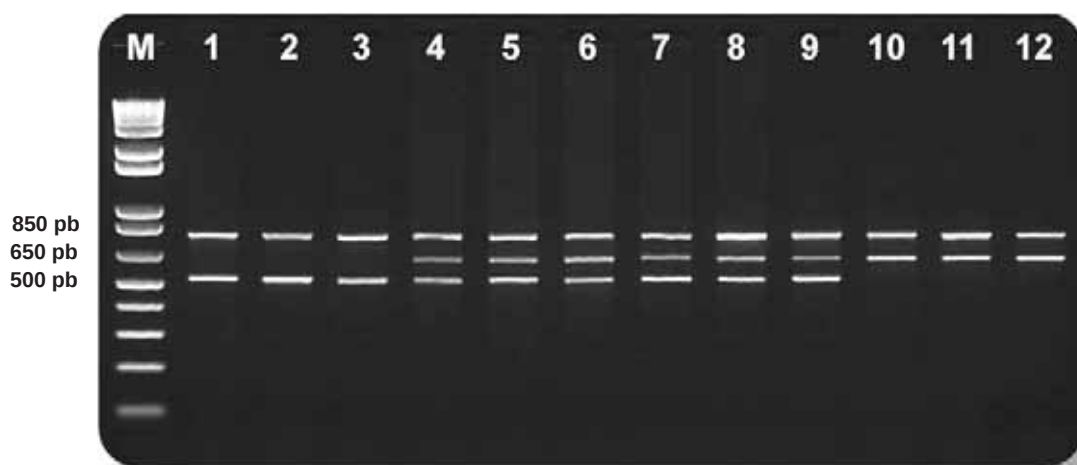


**Figura 57** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene EF1 $\alpha$ . *Pseudoplatystoma corruscans* (1-3), “Pintachara” (4-6), “Cachapinta” (7-9) e *P. reticulatum* (10-12). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.3.3 Identificação molecular de lotes de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)

Inicialmente, a identificação das amostras de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) provenientes dos lotes das Pisciculturas **A**, **C** e **H** foi realizada por análises de PCR-Multiplex, utilizando-se os genes nucleares RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$  e mitocondrial 16S. Posteriormente, como confirmação destes resultados, em uma amostragem destes lotes procedeu-se o método de PCR-RFLP com os mesmos genes, somado ao gene nuclear 18S, estabelecidos no tópico **3.3.2** (Tabela 14). É importante observar que em todas as reações Multiplex e PCR-RFLP realizados nesta fase de análise foram utilizadas amostras de DNA das espécies puras parentais, de forma a servir como controle para a especificidade das reações.

**Tabela 14** - Propriedade, lotes de peixes e número de exemplares (n) analisados por cada metodologia.

| Propriedade         | Lotes comprados      | n  | PCR-Multiplex<br>(16S, RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$ ) | PCR-RFLP<br>(16S, RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$ , 18S) |
|---------------------|----------------------|----|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Piscicultura A (SP) | <i>P. corruscans</i> | 20 | 20                                                | 10                                                |
| Piscicultura C (MS) | <i>P. corruscans</i> | 50 | 50                                                | 20                                                |
| Piscicultura H (SP) | <i>P. corruscans</i> | 20 | 20                                                | 10                                                |

Nas três pisciculturas em que foram comprados exemplares de estoques rotulados como Pintado, através da identificação molecular foram observados os mesmos resultados para todos os genes analisados. Através dos genes nucleares, verificou-se que em todos os lotes havia somente a presença de indivíduos híbridos entre *P. reticulatum* e *P. corruscans*.

Com a aplicação do gene RAG2 (PCR-Multiplex), os exemplares analisados demonstraram um padrão de heterozigoto em relação aos parentais, evidenciado por duas bandas diagnósticas, de 308 pb e 277 pb, herdadas de *P. reticulatum* e *P. corruscans*, respectivamente (Figura 58). Pelo marcador GLOB (PCR-Multiplex), o padrão de heterozigoto evidenciado nas amostras consistia dos fragmentos de 304 pb, herdada de *P. corruscans*, e 137 pb, proveniente de *P. reticulatum* (Figura 58). Da mesma forma, os resultados da amplificação do gene EF1 $\alpha$  revelaram à presença das bandas diagnósticas de ambas as espécies parentais, ou seja, de 520 pb da espécie *P. corruscans* e de 630 pb procedente de *P. reticulatum*.

Por fim, pela análise do gene 18S (PCR-RFLP), todas as amostras também apresentaram um padrão heterozigoto de três marcadores, de 163 pb, 187 pb e 350 pb, sendo duas herdadas de *P. corruscans* e uma de *P. reticulatum* (Figura 58). A aplicação do método de PCR-RFLP com os genes RAG2, GLOB e EF1 $\alpha$  confirmou os mesmos resultados apresentados pela técnica de PCR-Multiplex, corroborando a detecção da comercialização de híbridos F1 entre *P. reticulatum* e *P. corruscans* nos lotes de Pintado (Figura 59).

Em relação à utilização do marcador mitocondrial 16S, as amostras destes híbridos foram identificadas como pertencendo à linhagem híbrida “Cachapinta”, ou seja, com o padrão de identificação da espécie materna *P. reticulatum*. Assim, por PCR-Multiplex as amostras foram evidenciadas pela presença da banda de 388 pb (Figura 58), enquanto que por PCR-RFLP foram reveladas duas bandas características, de 285 pb e 327 pb.

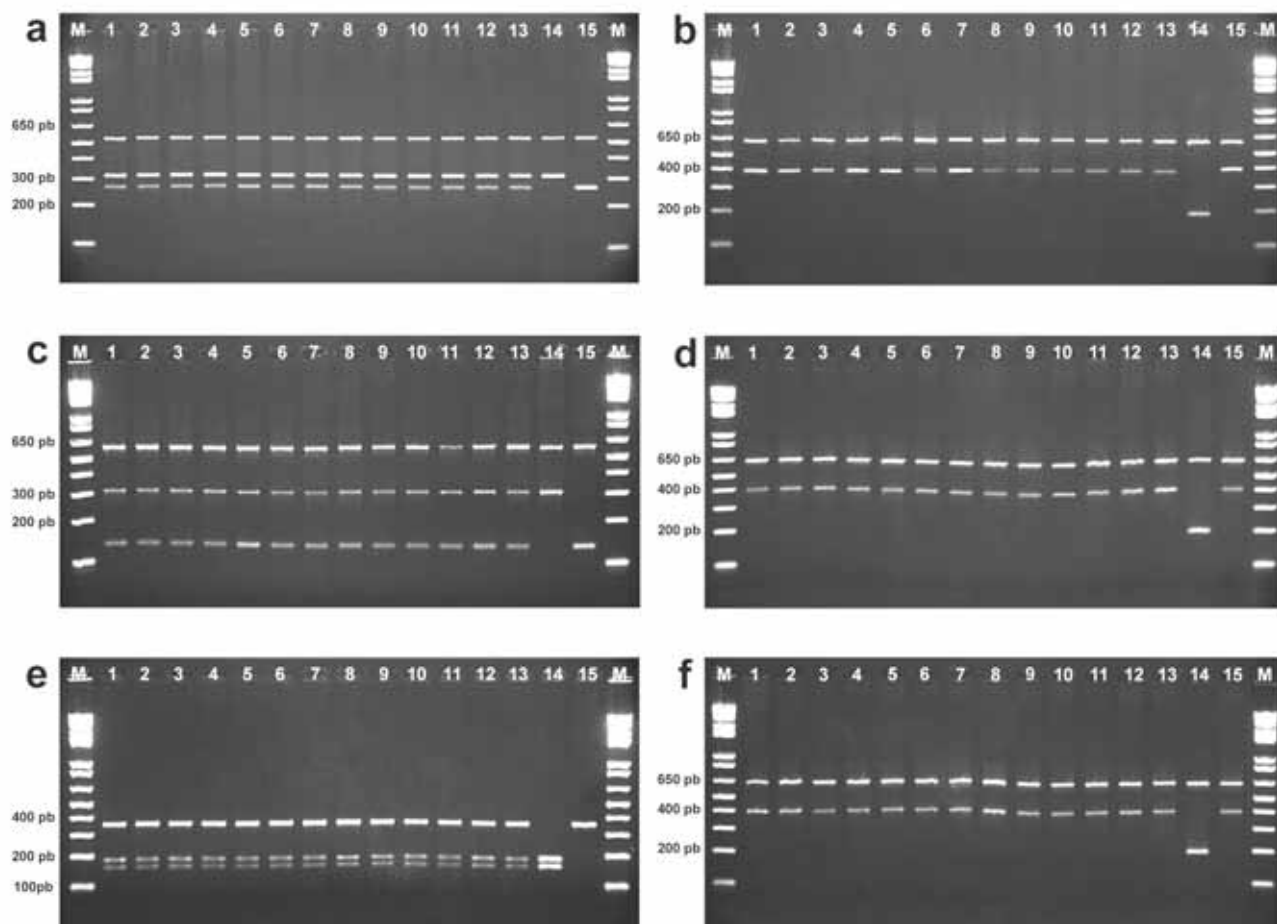


**Figura 58** – Padrões de identificação molecular dos estoques Pintado da Piscicultura A em (a) e (b), Piscicultura C em (c) e (d), e Piscicultura H em (e) e (f). Géis da esquerda: marcadores nucleares RAG2 (PCR-Multiplex) em (a), GLOB (PCR-Multiplex) em (c), e 18S (PCR-RFLP) em (e). Géis da direita: marcador mitocondrial 16S em PCR-Multiplex. Em (a), (c) e (e), colunas 1-13 correspondem ao padrão de identificação de híbrido. Em (b), (d) e (f), colunas 1-13 mostram o padrão mitocondrial de *P. reticulatum*. Colunas 14 e 15 são amostras das espécies puras *P. corruscans* e *P. reticulatum*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

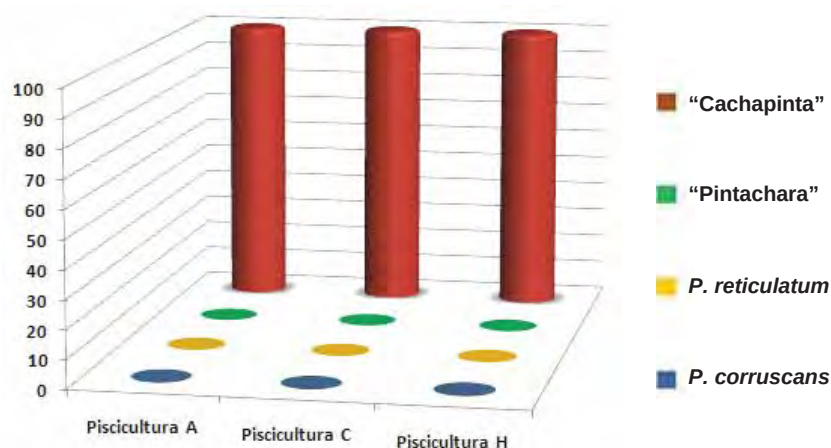


**Figura 59** – Resultados da identificação molecular. Todos os lotes continham somente exemplares de “Cachapinta”.

### 3.3.4 Identificação molecular de um plantel de matrizes de Pintado e Cachara

Com o intuito de prestar um serviço de aconselhamento genético, os métodos de identificação molecular estabelecidos neste estudo foram aplicados no plantel de 16 matrizes de uma grande piscicultura do Estado de São Paulo. Desta forma, os resultados obtidos podem ser utilizados na orientação de quais os cruzamentos que o piscicultor deve proceder, evitando prejuízos em seu empreendimento. Segundo a classificação do piscicultor, as amostras foram identificadas morfologicamente como Cachara (*P. reticulatum*), Pintado (*P. corruscans*) e híbrido, que seriam linhagens provenientes de cruzamentos entre estas duas espécies. Assim, após a identificação molecular, foi possível constatar se o piscicultor realmente estava realizando cruzamentos inadequados, ou seja, cruzando híbridos com espécies puras.

Com o propósito de analisar a integridade genética de seus peixes, a identificação das amostras foi realizada por análises de PCR-Multiplex, utilizando-se os genes nucleares RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$  e mitocondrial 16S. Posteriormente, como confirmação destes resultados, seguiu-se a técnica de PCR-RFLP com os mesmos genes, somado ao gene nuclear 18S, estabelecidos no tópico **3.3.2**.

A aplicação dos marcadores genéticos revelou a ocorrência de diferentes genótipos em um mesmo indivíduo, o que nitidamente caracteriza a presença de linhagens pós-F1 (Tabela 15). Nove exemplares tiveram estas características, que em alguns marcadores apresentaram genótipo de híbrido, enquanto em outros foram caracterizados pelo genótipo da espécie pura *P. corruscans* (Tabela 15 e Figura 60). Assim, como nenhum marcador indicou o genótipo puro de *P. reticulatum* nesses indivíduos pós-F1, há grande evidência que estas linhagens pós-F1 foram realizadas a partir de retrocruzamentos de híbridos com a espécie pura *P. corruscans*.

Além da constatação de linhagens pós-F1, foram identificados quatro exemplares híbridos F1, uma vez que em todos os marcadores nucleares (RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$  e 18S) foram obtidos padrões de eletroforese com genótipos heterozigotos. De acordo com as leis mendelianas e com a utilização de quatro marcadores nucleares, as possibilidades destes indivíduos serem considerados de linhagens pós-F1, oriundos de retrocruzamentos entre F1 x P (linhagens puras) ou intercruzamentos F1 x F1, são baixas, com probabilidade de 6,25%. Desta maneira, provavelmente estes indivíduos sejam de linhagens F1, que através do marcador mitocondrial 16S, duas amostras foram caracterizadas como “Cachapinta”, por apresentar DNA mitocondrial de *P. reticulatum*, e duas matrizes como “Pintachara”, pois tiveram genótipo mitocondrial de *P. corruscans* (Tabela 15 e Figura 60).

Por fim, apenas três se mostraram puras, ou seja, revelaram padrão molecular específico de apenas uma espécie em todos os marcadores nucleares e mitocondrial. Assim, foram identificadas duas matrizes puras de *P. reticulatum* e um exemplar de *P. corruscans* (Tabela 15 e Figura 60). Similarmente à identificação das linhagens híbridas F1, conforme as leis mendelianas e com o emprego de quatro *loci* nucleares, as chances destes indivíduos serem considerados linhagens pós-F1, provenientes de retrocruzamentos entre F1 x P (linhagens puras) ou intercruzamentos F1 x F1, são baixas, com probabilidades de 6,25% e 0,78%, respectivamente. Por isso, considera-se que provavelmente sejam amostras de espécies puras.

**Tabela 15** – Relação dos indivíduos analisados do plantel de matrizes e os respectivos genótipos de identificação molecular, com os marcadores mitocondrial e nuclear. A sigla **Pr** significa *Pseudoplatystoma reticulatum* e **Pc** corresponde a *Pseudoplatystoma corruscans*.

[illegible]

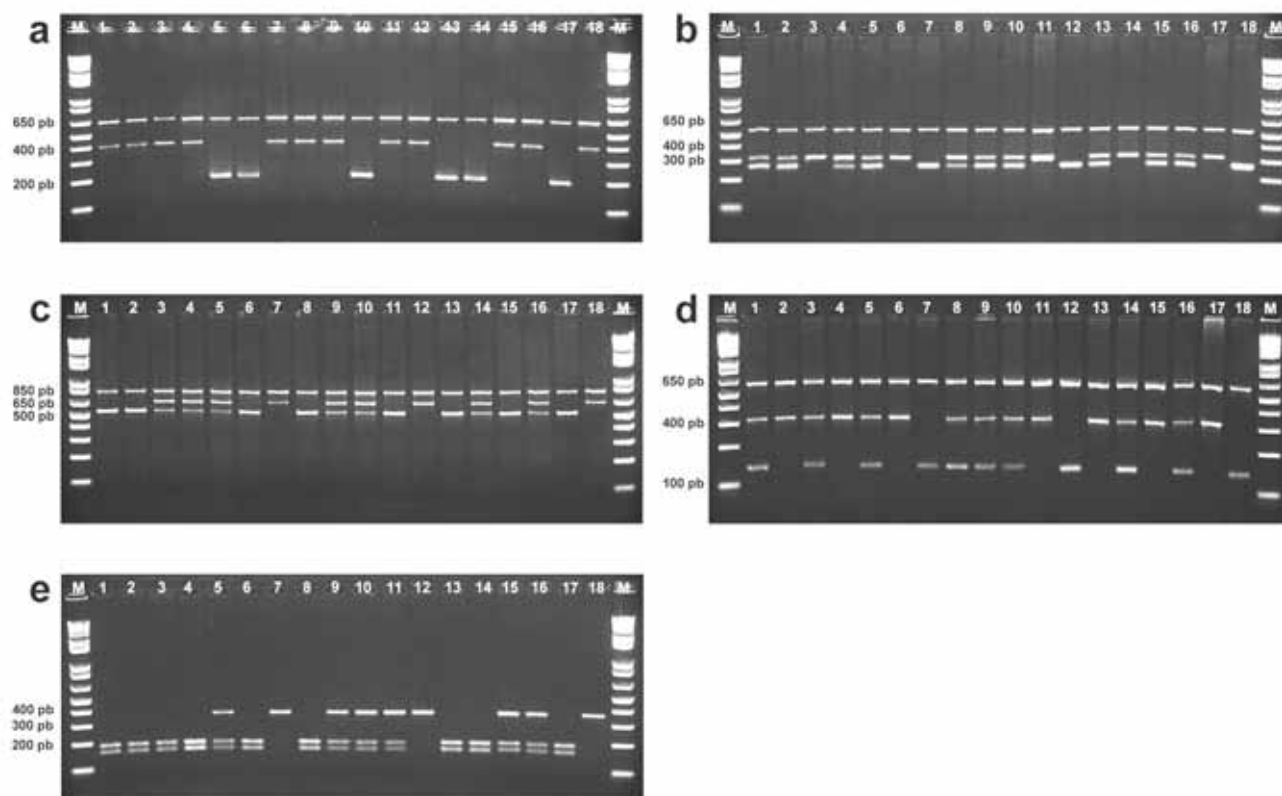


**Figura 60** – Padrões de identificação molecular das 16 matrizes analisadas do plantel. Géis dos marcadores de PCR-Multiplex 16S (a), RAG2 (b), EF1 $\alpha$  (c), GLOB (d), e 18S (PCR-RFLP) (e). Coluna (1) corresponde ao indivíduo com TAG 207671, (2) 189414, (3) 209759, (4) 228322, (5) 220165, (6) 242188, (7) 212966, (8) 203582, (9) 207521, (10) 194799, (11) 200159, (12) 198501, (13) 210218, (14) 189199, (15) 240850, e (16) 201222. Colunas 17 e 18 são amostras das espécies puras *P. corruscans* e *P. reticulatum*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.4.1 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre *Pseudoplatystoma corruscans*, *Leiarius marmoratus* e *P. reticulatum*

No intuito de identificar os híbridos interespecíficos resultantes entre os cruzamentos de *Pseudoplatystoma corruscans* x *Leiarius marmoratus* e *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*, os resultados deste estudo foram planejados de forma a utilizar os marcadores moleculares já obtidos na diferenciação entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*, descritos no tópico 3.3.1, adicionando novos marcadores para a distinção da espécie *L. marmoratus*. Desta forma, foram sequenciados o gene mitocondrial 16S e nuclear RAG2 (*Recombination Activating Gene 2*) da espécie *L. marmoratus*. Os resultados permitiram a análise de 612 pb do gene 16S (11 sítios polimórficos) e de 521 pb do gene RAG2 (13 sítios polimórficos). A comparação das espécies de *Pseudoplatystoma* com *L. marmoratus* indicou os valores médios de divergência genética de 0.014 (16S) e 0.022 (RAG2).

#### PCR-RFLP

Os resultados obtidos pelos mapas de restrição evidenciaram algumas enzimas com cortes espécies-específicos. Para clivagem do gene mitocondrial 16S, foram utilizados as enzimas SmlI e NlaIII, com sítios de clivagem nas espécies *P. reticulatum* e *L. marmoratus* (Figura 61), respectivamente. Em relação ao gene nuclear RAG2, além da enzima Sau96I, com corte exclusivo em *P. corruscans*, utilizou-se a enzima BslI para clivagem específica da sequência de *L. marmoratus* (Figura 62).

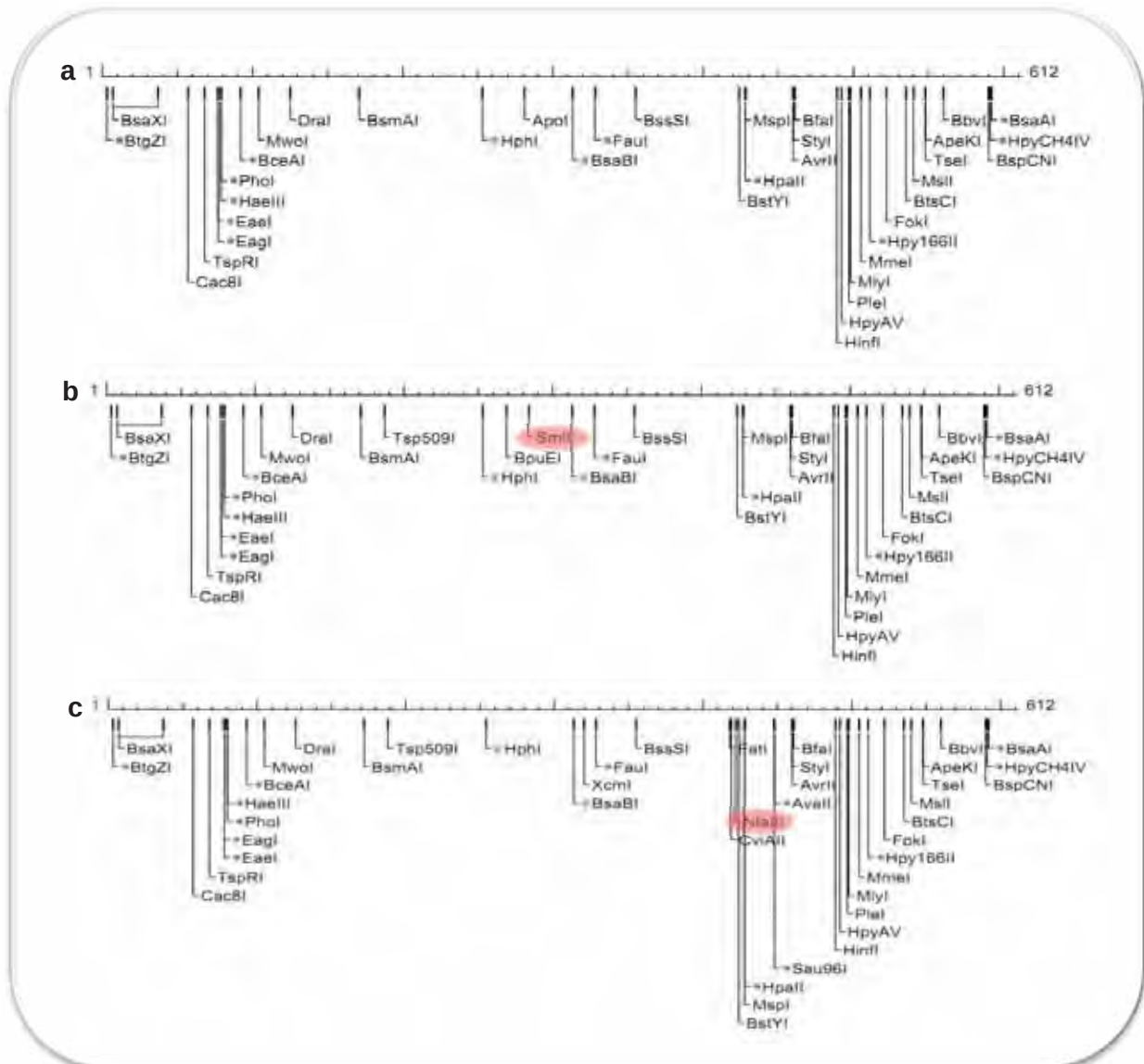


**Figura 61** - Mapas de restrição do gene mitocondrial 16S para a espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a), *P. reticulatum* (b), e *Leiarius marmoratus* (c). Em destaque, as enzimas SmaI e NlaIII, com sítio de restrição apenas em *P. reticulatum* e *L. marmoratus*, respectivamente.

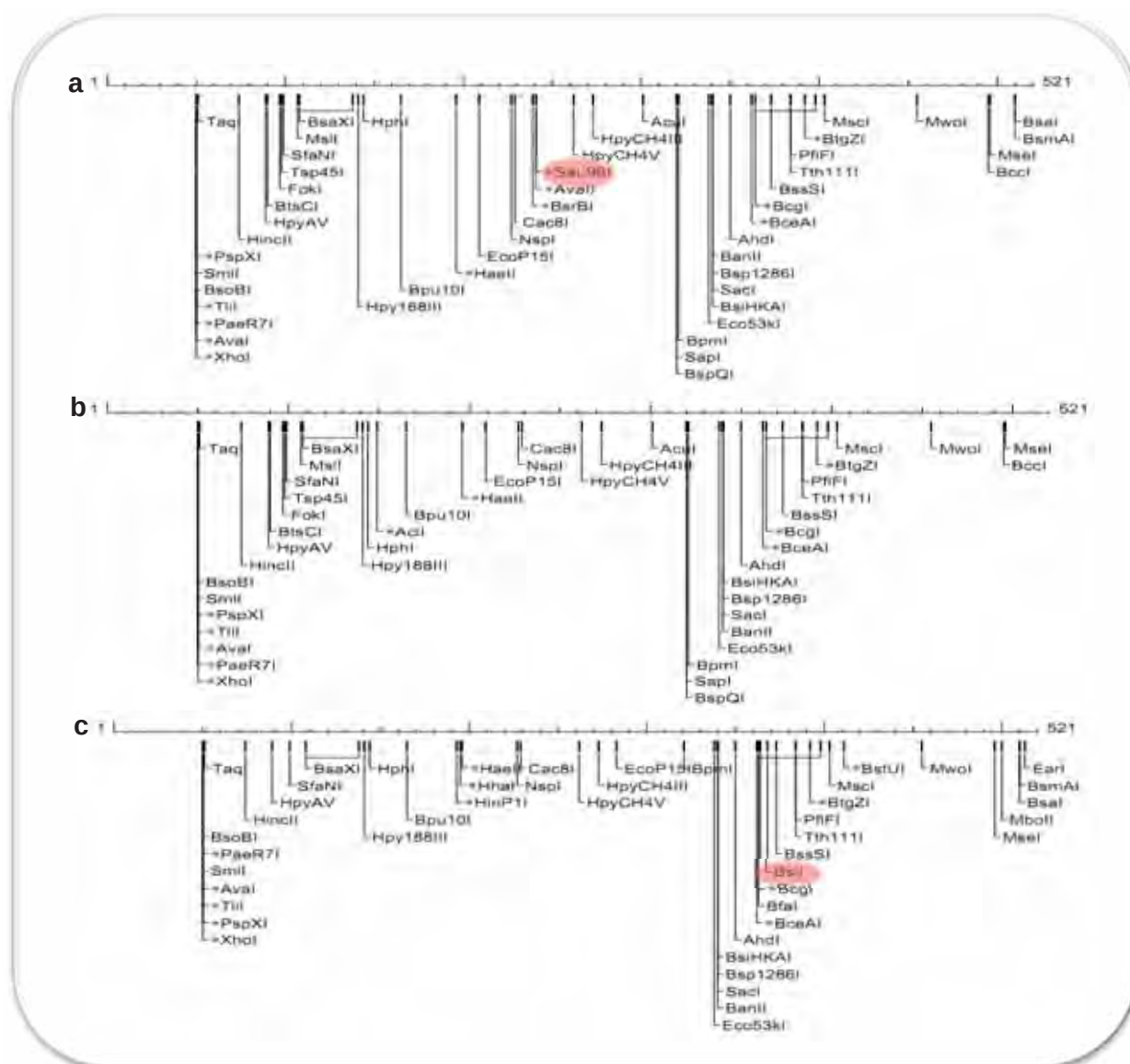


**Figura 62** - Mapas de restrição do gene nuclear RAG2 para a espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a), *P. reticulatum* (b), e *Leiarius marmoratus* (c). Em destaque, as enzimas Sau96I e BstI, com sítio de restrição apenas em *P. corruscans* e *L. marmoratus*, respectivamente.

Análises das amplificações do gene mitocondrial 16S (primers 16S F e 16S R), submetidas à clivagem pelas enzimas NlaIII e SmaI, demonstraram nas amostras de *P. corruscans* um perfil eletroforético contendo uma única banda de 612 pb, pois não apresentaram sítio de clivagem. Devido à ação enzimática, os exemplares de *L. marmoratus* revelaram dois alelos diagnósticos, de aproximadamente 193 pb e 419 pb, enquanto os indivíduos de *P. reticulatum* também mostraram duas bandas,

porém com 285 pb e 327 pb. Nas amostras de “Pintadiá” observou-se o mesmo perfil de eletroforese do parental materno *P. corruscans*, enquanto que o híbrido “Cachandiá” mostrou os mesmos marcadores do parental materno *P. reticulatum* (Figura 63).



**Figura 63** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene 16S. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintadiá” (3-4), *Leiarius marmoratus* (5-6), “Cachandiá” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Digestão enzimática (Sau96I e BslI) dos produtos amplificados do gene nuclear RAG2 (primers *RAG2 SiluF* e *RAG2 SiluR*) demonstrou na amostragem de *P. corruscans* um perfil de duas bandas, de 242 pb e 279 pb, enquanto que nos exemplares de *L. marmoratus* a presença de dois marcadores, de 155 pb e 366 pb, em consequência da clivagem gênica. Já as amostras de *P. reticulatum* mostraram apenas uma banda, de 521 pb, sem cortes. Em relação às linhagens híbridas, nos indivíduos de “Pintadiá” foi observado um padrão de quatro bandas, 155 pb, 242 pb, 279 pb e 366 pb. Similarmente, as amostras do híbrido “Cachandiá” apresentaram três tamanhos de fragmentos, 155 pb, 366 pb e 521 pb (Figura 64).



**Figura 64** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene RAG2. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintadiá” (3-4), *Leiarius marmoratus* (5-6), “Cachandiá” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### PCR-Multiplex

Para o gene mitocondrial 16S, além dos primers *16S PcF* (específico para *P. corruscans*) e *16S PrR* (exclusivo de *P. reticulatum*), foi estabelecido o primer *16S LemR* (específico para *L. marmoratus*), numa diferente região do sentido *Reverse* e envolvendo duas mutações (Tabela 16). Em relação ao gene nuclear RAG2, adicionalmente aos primers *RAG2 PcR* (*P. corruscans*) e *RAG2 PrR* (*P. reticulatum*), foi desenvolvido o primer *RAG2 LemR*, no sentido *Reverse* e posicionado em quatro mutações, para amplificar um fragmento específico para *L. marmoratus* (Tabela 16).

**Tabela 16** - Primers espécie-específicos para amplificação dos genes mitocondrial 16S e nuclear RAG2.

| Primers          | Sequências dos primers              |
|------------------|-------------------------------------|
| <i>16S PcF</i>   | 5'- TGACCATAAAGATCCGGCTAT -3'       |
| <i>16S PrR</i>   | 5'- TCTTGGTTTTGGGGTTGTTA -3'        |
| <i>16S LemR</i>  | 5'- GGTTCGCTATTTAGTTTGACTTAGTTC -3' |
| <i>RAG2 PcR</i>  | 5'- AACTCCAGGTCAATGAGATAAATG -3'    |
| <i>RAG2 PrR</i>  | 5'- GACAGTCCACCATGCAGTTCCAGG -3'    |
| <i>RAG2 LemR</i> | 5'- CTAAGGGTGTGACCATACCGA -3'       |

Análises de amplificações do DNA mitocondrial 16S em reação Multiplex (primers 16S F, 16S R, 16S PcF, 16S PrR e 16S LemF) demonstraram em todas as amostras uma banda de 612 pb, como controle da reação; além de uma banda específica para os indivíduos de cada espécie, de 197 pb para *P. corruscans*, de 388 pb para *P. reticulatum* e de 307 pb para *L. marmoratus* (Figuras 65 e 66). Já nas amostras de “Pintadiá” observou-se o mesmo perfil do parental materno *P. corruscans*, enquanto “Cachandiá” mostrou o mesmo genótipo de *P. reticulatum*.

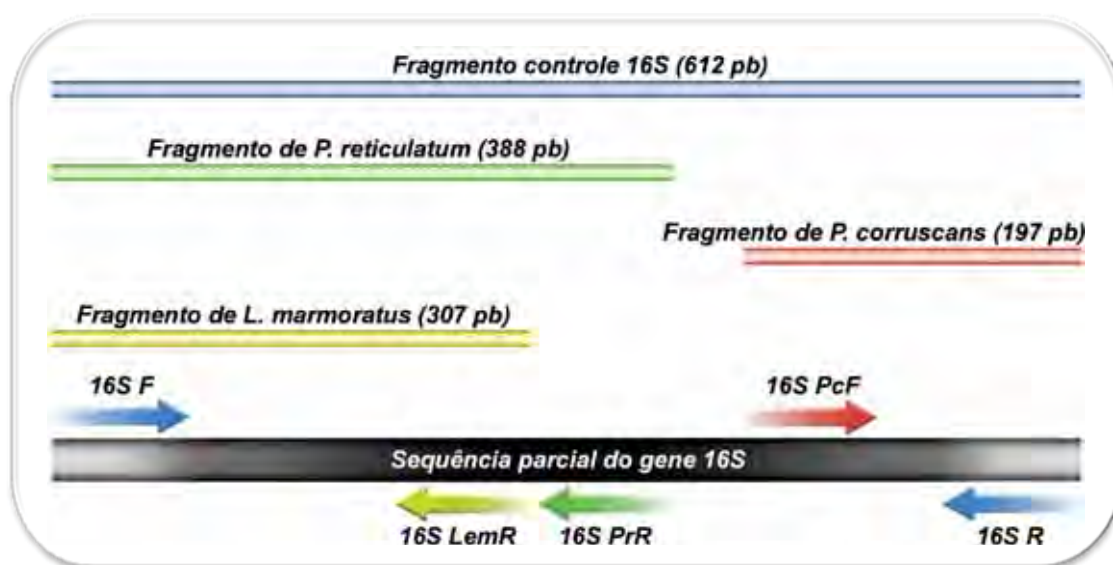


**Figura 65** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene mitocondrial 16S.

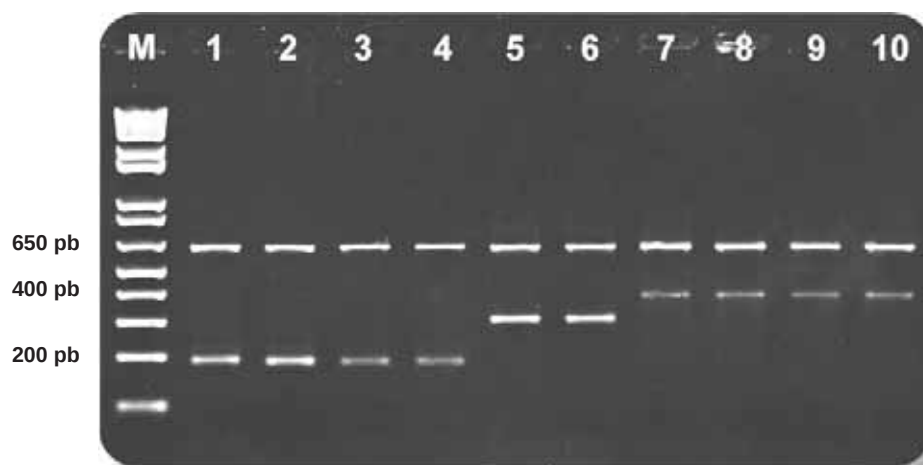


**Figura 66** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene 16S. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintadiá” (3-4), *Leiarius marmoratus* (5-6), “Cachandiá” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Os resultados da PCR-Multiplex do gene nuclear RAG2 (primers *RAG2 SiluF*, *RAG2 SiluR*, *RAG2 PcR*, *RAG2 PrR* e *RAG2 LemR*) evidenciaram em todas as amostras um fragmento controle de 521 pb. Além disso, os exemplares de *P. corruscans* revelaram uma banda de 308 pb, enquanto os indivíduos de *P. reticulatum* um fragmento de 277 pb e de *L. marmoratus* uma banda de 170 pb (Figuras 67 e 68). Nos híbridos observou-se um padrão de heterozigoto, de 308 pb e 170 pb para “Pintadiá”, e 277 pb e 170 pb para “Cachandiá”.

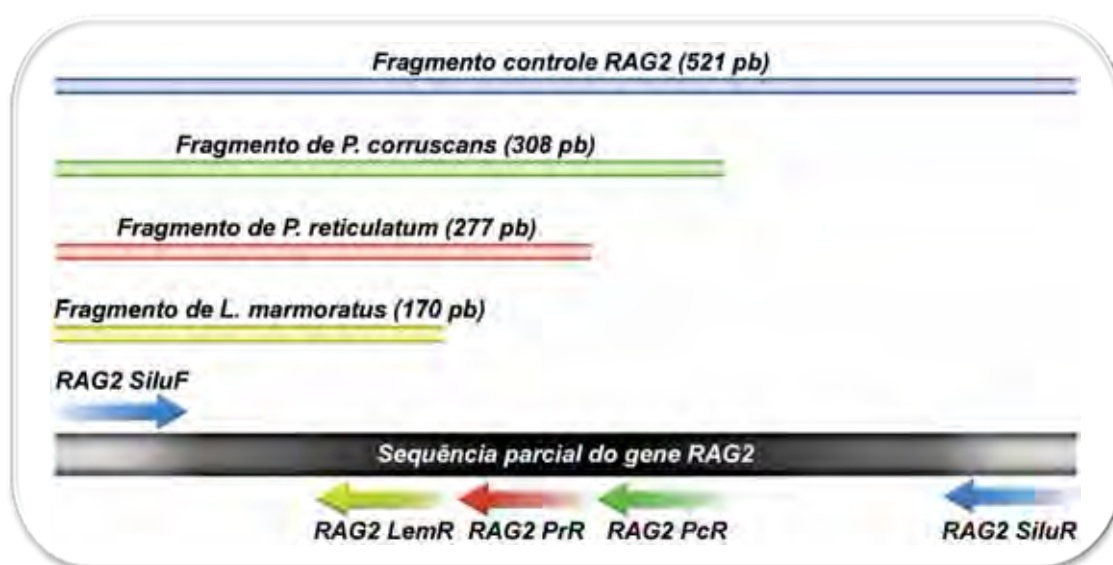


**Figura 67** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene nuclear RAG2.

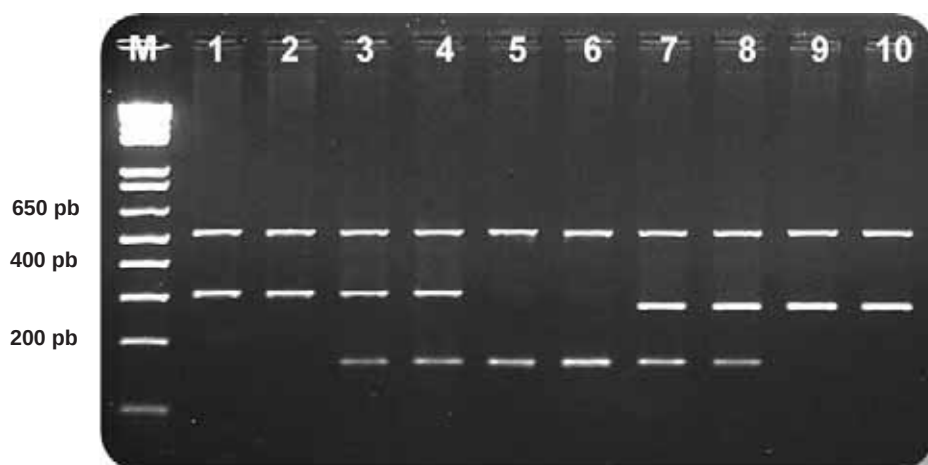


**Figura 68** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene RAG2. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintadiá” (3-4), *Leiarius marmoratus* (5-6), “Cachandiá” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.4.2 Identificação molecular de lotes de “Cachandiá”

Inicialmente, com o intuito de caracterização dos estoques de “Cachandiá” das Pisciculturas **F** e **G**, todas as amostras foram identificadas com os métodos de PCR-Multiplex e PCR-RFLP do gene nuclear RAG2 e mitocondrial 16S, estabelecidos no tópico **3.4.1**. Porém, uma vez que se obtiveram resultados não esperados nos exemplares da Piscicultura **F**, foram empregados os marcadores nucleares GLOB, EF1 $\alpha$  e 18S, na tentativa de verificar se foram usadas linhagens híbridas entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* nos cruzamentos resultantes destes peixes. Para estes genes, não há marcadores de PCR-Multiplex ou PCR-RFLP estabelecidos para a identificação de *L. marmoratus*, sendo que o principal intuito foi de verificar se apresentava DNA de *P. reticulatum* ou *P. corruscans*. Em todas as reações Multiplex e PCR-RFLP realizados nesta fase de análise foram utilizadas amostras de DNA das espécies puras parentais, como controle para a especificidade das reações.

Nas amostras vendidas comercialmente como híbrido “Cachandiá” da Piscicultura **G**, utilizando o marcador nuclear RAG2 (PCR-Multiplex), de forma esperada todos os peixes apresentaram perfil de eletroforese evidenciado por um genótipo heterozigoto, com dois alelos de amplificação (170 pb e 277 pb), sendo assim, caracterizados como híbridos entre *P. reticulatum* e *L. marmoratus* (Figura 69). Através do marcador mitocondrial 16S (PCR-Multiplex), o padrão de eletroforese destes indivíduos teve um marcador de 388 pb, específico de *P. reticulatum* (Figura 69) e, portanto, reconhecidos como híbridos “Cachandiá”. A utilização do método de PCR-RFLP confirmou os mesmos resultados.

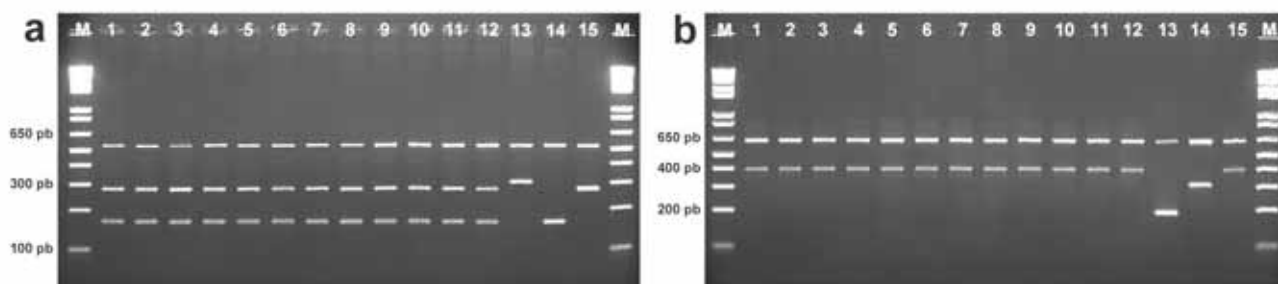


**Figura 69** – Padrões de identificação molecular do estoque de “Cachandiá” da Piscicultura **G**. (a) e (b) são resultados de PCR-Multiplex dos genes nuclear RAG2 e mitocondrial 16S, respectivamente. Em (a), colunas **1-12** correspondem ao padrão de identificação de “Cachandiá”. Em (b), colunas **1-12** mostram o padrão mitocondrial de *Pseudoplatystoma reticulatum*. Colunas **13, 14 e 15** são amostras de DNA das espécies puras *P. corruscans*, *Leiarius marmoratus* e *P. reticulatum*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; **M**, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Em relação aos juvenis de “Cachandiá” da Piscicultura **F**, utilizando o marcador nuclear RAG2 (PCR-Multiplex), foram observados dois padrões de eletroforese (Figura 70): 20 exemplares foram evidenciados com um diagnóstico de genótipo heterozigoto, com dois alelos de amplificação (170 pb e 277 pb), caracterizados para linhagens híbridas entre *P. reticulatum* e *L. marmoratus*; no entanto, 21 indivíduos também revelaram um padrão de heterozigoto, porém com os fragmentos específicos de 170 pb e 308 pb, que são caracterizados para híbridos entre *P. corruscans* e *L. marmoratus*. Em relação à análise do genoma mitocondrial, todas as amostras mostraram o fragmento gênico característico da espécie *P. reticulatum*, mesmo nas linhagens híbridas entre *P. corruscans* e *L. marmoratus*, o que tornou duvidoso sobre o verdadeiro cruzamento que originou estas amostras (Figura 70). A aplicação destes genes pela técnica de PCR-RFLP confirmou os mesmos resultados.

Assim, os dados permitiram levantar à hipótese destes juvenis serem resultantes de um retrocruzamento da linhagem híbrida “Cachapinta” (fêmea de *P. reticulatum* e macho de *P. corruscans*) com a espécie pura *L. marmoratus*. Para

testar esta hipótese, aplicamos outros marcadores nucleares no sentido de verificar se estas amostras herdaram DNA da espécie *P. corruscans* ou de *P. reticulatum*.

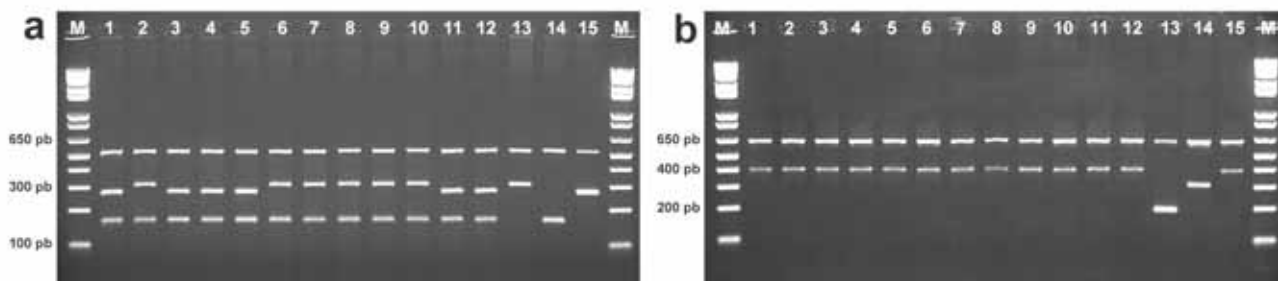


**Figura 70** – Padrões de identificação do estoque de “Cachandiá” da Piscicultura F. (a) e (b) são resultados de PCR-Multiplex dos genes nuclear RAG2 e mitocondrial 16S, respectivamente. Em (a), colunas **1, 3-5, 11 e 12** correspondem ao padrão de identificação de “Cachandiá”; **2 e 6-10** padrão de “Pintadiá”. Em (b), colunas **1-12** mostram o padrão mitocondrial de *Pseudoplatystoma reticulatum*. Colunas **13, 14 e 15** são amostras de DNA das espécies puras *P. corruscans*, *Leiarius marmoratus* e *P. reticulatum*, respectivamente, usadas como controle da reação; **M**, 1 Kb Plus DNA Ladder.

A aplicação de marcadores genéticos adicionais (GLOB, EF1 $\alpha$  e 18S) revelou a ocorrência de diferentes genótipos em um mesmo indivíduo, ou seja, em alguns marcadores uma mesma amostra apresentava o fragmento específico de *P. reticulatum*, enquanto que por outros marcadores demonstrava o DNA de *P. corruscans*, o que claramente caracterizou a ocorrência de linhagens pós-F1 (Tabela 17). Assim, há grande evidência de que estas linhagens pós-F1 foram realizadas a partir de um retrocruzamento da espécie pura *L. marmoratus* com a linhagem híbrida “Cachapinta” (*P. reticulatum* x *P. corruscans*), pois os indivíduos deste cruzamento exibiram tanto o DNA de *P. reticulatum* quanto o DNA de *P. corruscans*, e sempre com o DNA mitocondrial proveniente de *P. reticulatum*.

**Tabela 17** – Relação dos indivíduos de “Cachandiá” da Piscicultura F e os respectivos genótipos de identificação molecular. *P. reticulatum* (**Pr**), *P. corruscans* (**Pc**) e *L. marmoratus* (**Lm**).

| Identificação | 16S |    |    | RAG2 |    |    | GLOB |    | EF1 $\alpha$ |    | 18S |    |
|---------------|-----|----|----|------|----|----|------|----|--------------|----|-----|----|
|               | Pr  | Lm | Pc | Pr   | Lm | Pc | Pr   | Pc | Pr           | Pc | Pr  | Pc |
| F301          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F302          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F303          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F304          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | x   | -  |
| F305          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | x   | -  |
| F306          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | x            | -  | -   | x  |
| F307          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | -   | x  |
| F308          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F309          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F310          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F311          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F312          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F313          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | x            | -  | x   | -  |
| F314          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F315          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F316          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F317          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F318          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F319          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F320          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | -   | x  |
| F321          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | -   | x  |
| F322          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | x            | -  | -   | x  |
| F323          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F324          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | -   | x  |
| F325          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F326          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | x            | -  | -   | x  |
| F327          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F328          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F329          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | -   | x  |
| F330          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F331          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F332          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | x   | -  |
| F333          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | x            | -  | x   | -  |
| F334          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | x    | -  | -            | x  | -   | x  |
| F335          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F336          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |
| F337          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | x   | -  |
| F338          | x   | -  | -  | -    | x  | x  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F339          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | x    | -  | -            | x  | -   | x  |
| F340          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | -            | x  | x   | -  |
| F341          | x   | -  | -  | x    | x  | -  | -    | x  | x            | -  | -   | x  |

### 3.4.3 Marcadores moleculares na identificação de híbridos entre *Pseudoplatystoma corruscans*, *Phractocephalus hemioliopterus* e *P. reticulatum*

Tendo em vista o objetivo de caracterizar os híbridos entre os cruzamentos de *Pseudoplatystoma corruscans* x *Phractocephalus hemioliopterus* e *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Phractocephalus hemioliopterus*, e uma vez que já foram estabelecidos os marcadores para as espécies de *Pseudoplatystoma*, de acordo com os dados do tópico 3.2.1, os resultados deste estudo foram planejados para acrescentar novos marcadores na diferenciação de *P. hemioliopterus*. Portanto, foram obtidos as sequências dos genes mitocondrial 16S e nuclear RAG2 (*Recombination Activating Gene 2*) da espécie *P. hemioliopterus*. Os resultados possibilitaram a análise de 612 pb do gene 16S (24 sítios polimórficos) e de 521 pb do gene RAG2 (16 sítios polimórficos). A comparação das espécies de *Pseudoplatystoma* com *P. hemioliopterus* mostrou os valores médios de 0.036 (16S) e 0.028 (RAG2).

#### PCR-RFLP

As informações dos mapas de restrição demonstraram a presença de algumas enzimas para diferenciação de *P. hemioliopterus*. Para a identificação através do gene mitocondrial 16S foram utilizados as enzimas SmlI e NlaIV, com pontos de clivagem em *P. reticulatum* e *P. hemioliopterus* (Figura 71), respectivamente. Em relação ao gene nuclear RAG2, além da enzima Sau96I, com corte na sequência de *P. corruscans*, aplicou-se a enzima BfaI, cuja digestão enzimática é específica do fragmento gênico de *P. hemioliopterus* (Figura 72).

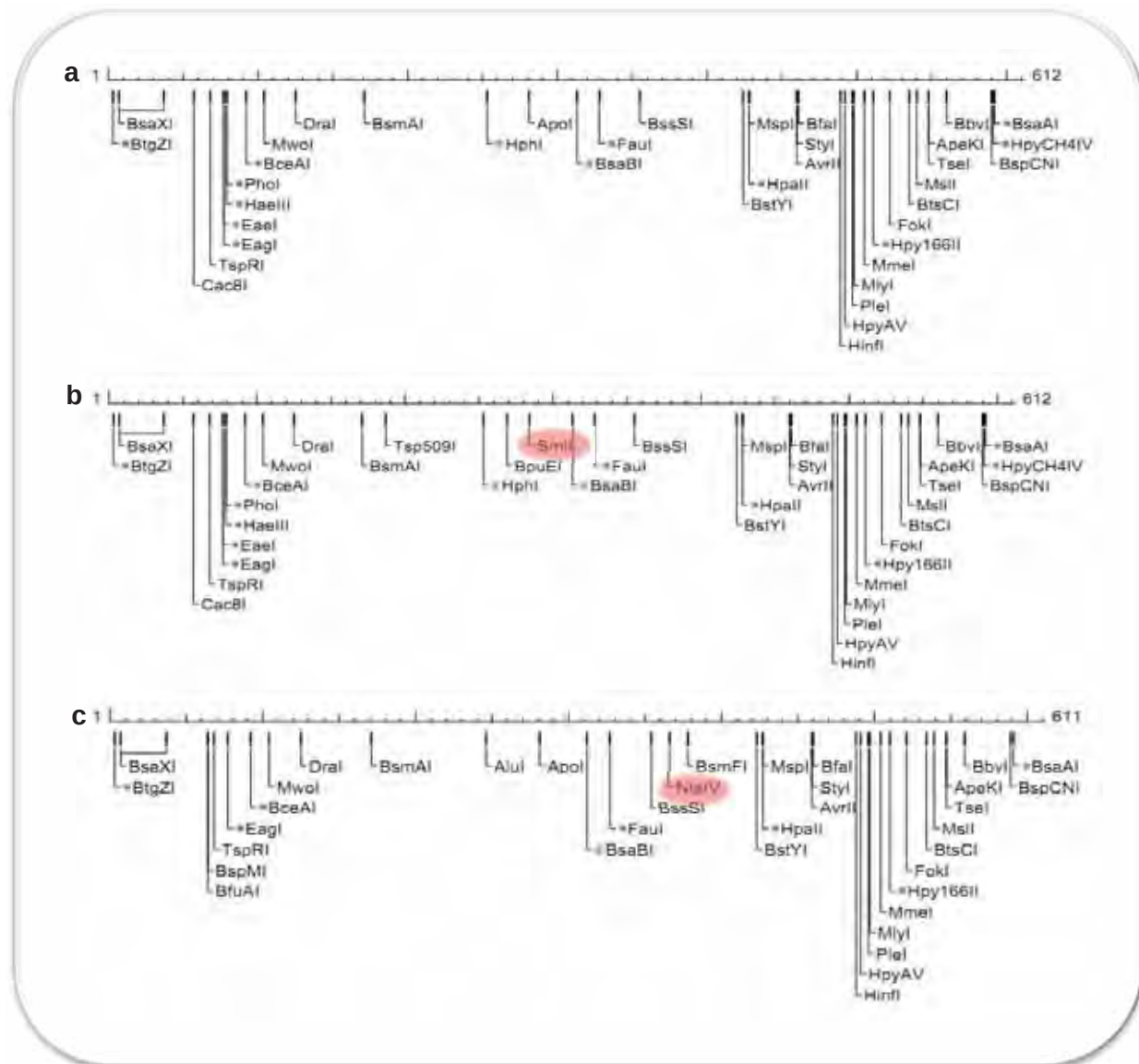


**Figura 71** - Mapas de restrição do gene mitocondrial 16S da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a), *P. reticulatum* (b) e *Phractocephalus hemiliopterus* (c). Em destaque as enzima SmII e NlaIV, com sítio de restrição em *P. reticulatum* e *Phractocephalus hemiliopterus*, respectivamente.

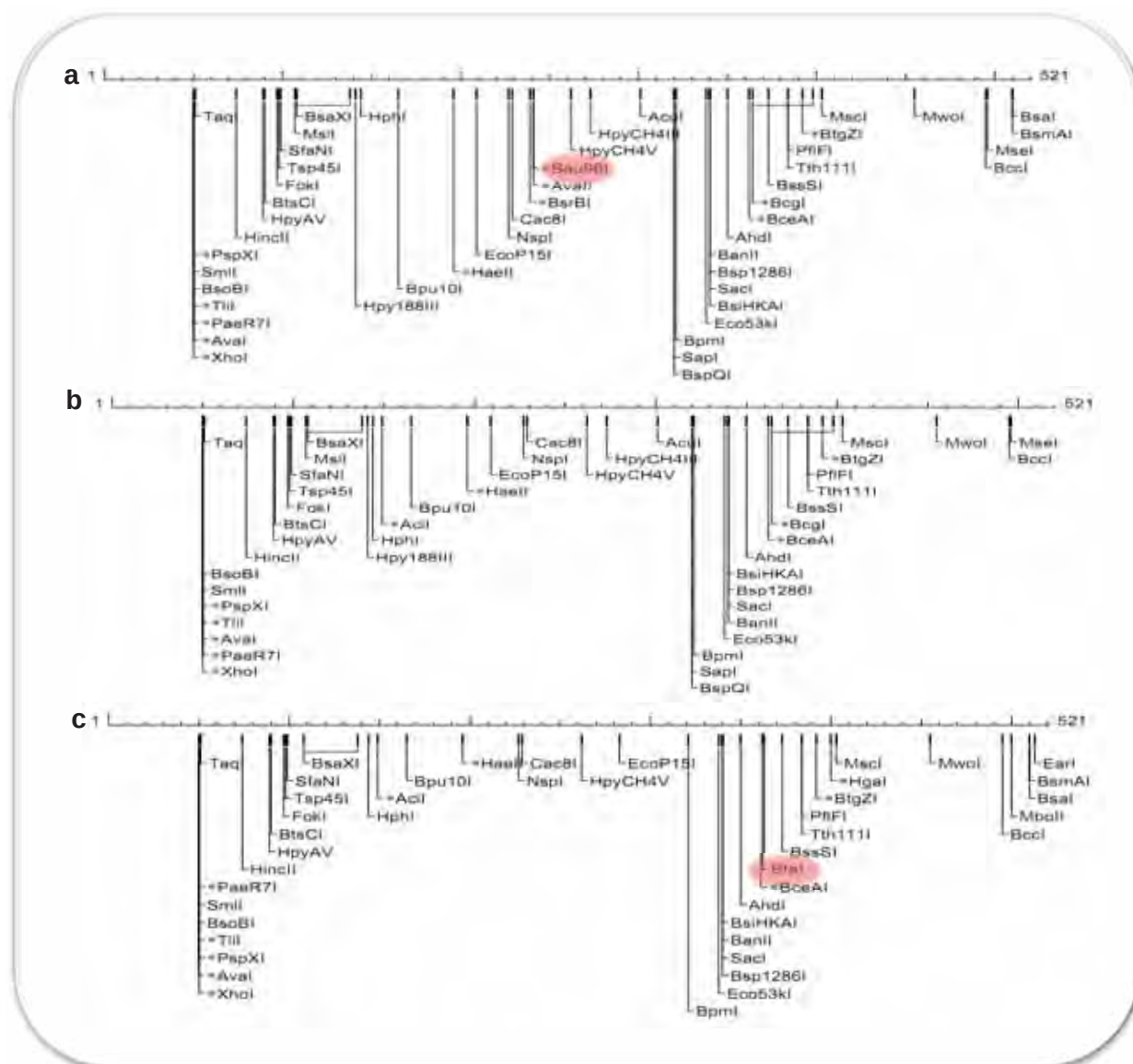


**Figura 72** - Mapas de restrição do gene nuclear RAG2 da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (a), *P. reticulatum* (b) e *Phractocephalus hemiliopterus* (c). Em destaque as enzima Sau96I e BfaI, com sítio de restrição em *P. corruscans* e *Phractocephalus hemiliopterus*, respectivamente.

Amplificações do gene mitocondrial 16S (primers 16S F e 16S R) submetidas à digestão pelas enzimas SmaI e NlaIV revelaram para as amostras de *P. reticulatum* o perfil de eletroforese contendo uma única banda de 612 pb, pois não revelaram sítio de clivagem das enzimas. Diferentemente, os indivíduos de *P. corruscans* foram diagnosticados pela presença de duas bandas, de 285 pb e 327 pb, enquanto os

exemplares de *P. hemioliopus* exibiram dois marcadores diagnósticos, de 245 pb e 367 pb, produtos gerados pela ação das enzimas. O mesmo genótipo mitocondrial de *P. reticulatum* foi observado nas amostras de “Cachapira”, enquanto que de *P. corruscans* foi observado para “Pintapira” (Figura 73).

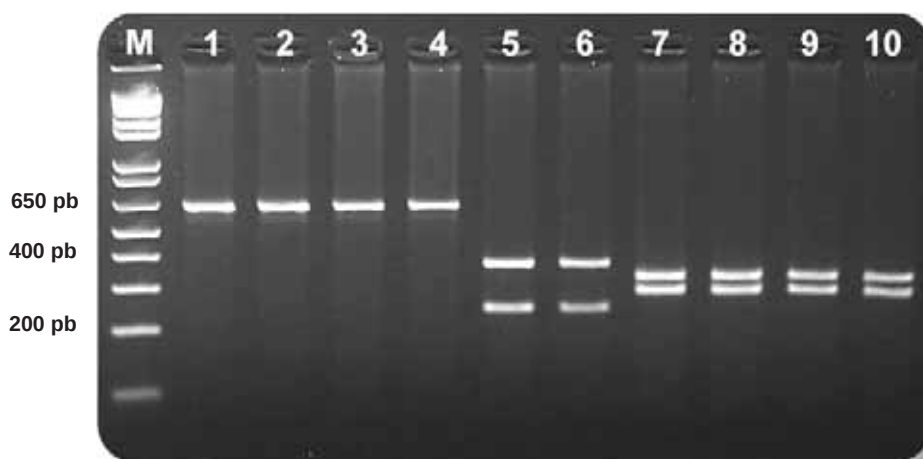


**Figura 73** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene 16S. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintapira” (3-4), *Phractocephalus hemioliopus* (5-6), “Cachapira” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Em relação ao gene nuclear RAG2, produtos da amplificação gênica (primers *RAG2 SiluF* e *RAG2 SiluR*) digeridos pelas enzimas *Sau96I* e *BfaI* evidenciaram duas bandas para amostras de *P. corruscans*, de 242 pb e 279 pb. Similarmente, os exemplares de *P. hemioliopus* revelaram dois marcadores diagnósticos, porém, de 157 pb e 364 pb, que foram obtidos a partir da clivagem gênica. Diferentemente, os exemplares de *P. reticulatum* demonstraram apenas uma banda, de 521 pb, sem cortes. Em relação aos produtos híbridos, nos indivíduos de “Pintapira” foi obtido um padrão heterozigoto de quatro bandas, 157 pb, 242 pb, 279 pb e 364 pb, enquanto que os exemplares de “Cachapira” tiveram três marcadores, 157 pb, 364 pb e 521 pb (Figura 74).

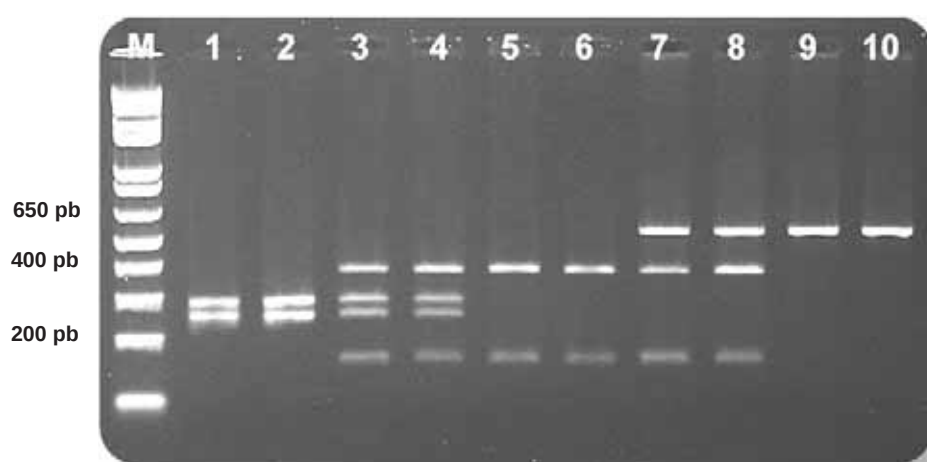


**Figura 74** - Gel de agarose da PCR-RFLP do gene RAG2. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintapira” (3-4), *Phractocephalus hemioliopus* (5-6), “Cachapira” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### PCR-Multiplex

Em relação ao gene 16S, adicionalmente aos primers *16S PcF* e *16S PrR*, específicos para *P. corruscans* e *P. reticulatum*, foi desenhado o primer *16S PhF*, diagnóstico para *P. hemioliopus*, no sentido *Forward* e envolvendo duas mutações (Tabela 18). Em relação ao gene nuclear RAG2, com o objetivo de ser aplicado em reações Multiplex juntamente com os primers *RAG2 PcR* (característico para *P. corruscans*) e *RAG2 PrR* (específico para *P. reticulatum*), foi desenvolvido o primer *RAG2 PhF*, no sentido *Forward* e posicionado em três mutações (Tabela 18).

**Tabela 18** - Primers espécie-específicos para amplificação dos genes mitocondrial 16S e nuclear RAG2.

| Primers         | Sequências dos primers           |
|-----------------|----------------------------------|
| <i>16S PcF</i>  | 5'- TGACCATAAAGATCCGGCTAT -3'    |
| <i>16S PrR</i>  | 5'- TCTTGGTTTTGGGGTTGTTA -3'     |
| <i>16S PhF</i>  | 5'- AAATAAATAGCCACCTGATCCA -3'   |
| <i>RAG2 PcR</i> | 5'- AACTCCAGGTCAATGAGATAAATG -3' |
| <i>RAG2 PrR</i> | 5'- GACAGTCCACCATGCAGTTCCAGG -3' |
| <i>RAG2 PhF</i> | 5'- CTGTTCAGCACACACCCTG -3'      |

Através das reações PCR-Multiplex do gene 16S (16S F, 16S R, 16S PcF, 16S PrR e 16S PhF), em todas as amostras foi observada uma banda controle de 612 pb, em adição a um alelo específico para os indivíduos de cada espécie, de 197 pb para *P. corruscans*, 388 pb para *P. reticulatum* e 320 pb para *P. hemioliopterus* (Figuras 75 e 76). Nas amostras de “Pintapira” foi encontrado o mesmo genótipo de *P. corruscans*, enquanto que os indivíduos de “Cachapira” demonstraram as mesmas bandas do parental materno *P. reticulatum*.

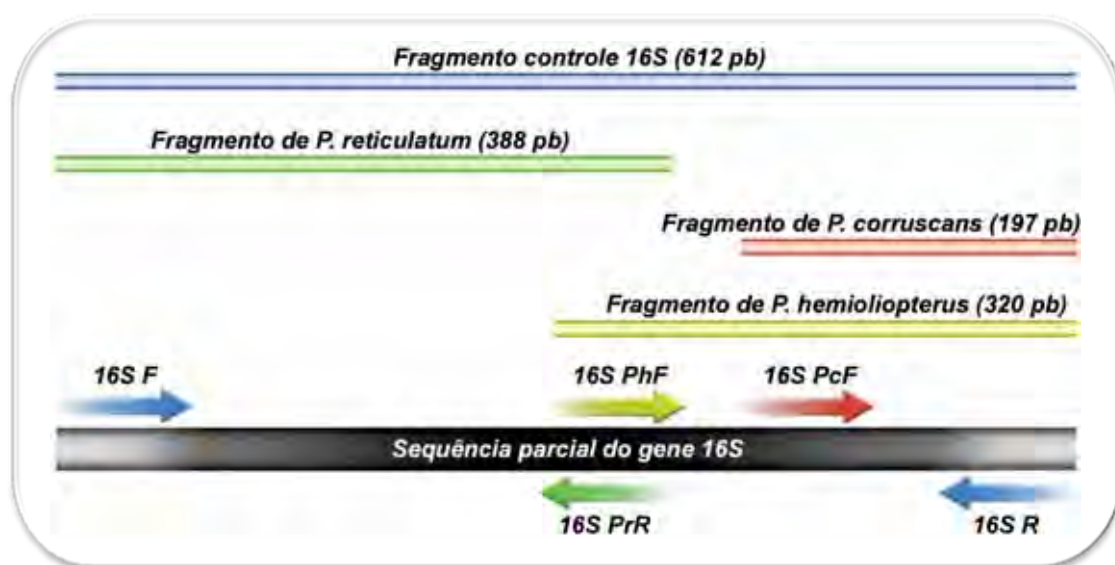


**Figura 75** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene mitocondrial 16S.

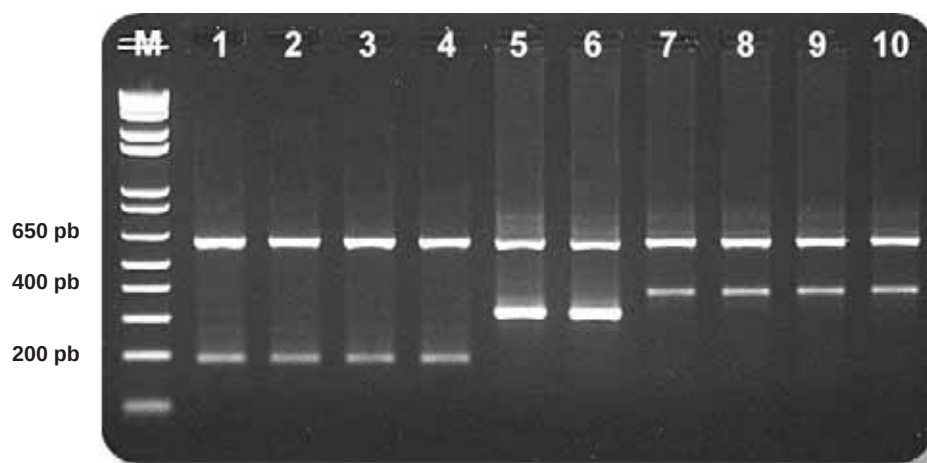


**Figura 76** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene 16S. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintapira” (3-4), *Phractocephalus hemioliopterus* (5-6), “Cachapira” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

Análises da PCR-Multiplex do gene nuclear RAG2 (*RAG2 SiluF*, *RAG2 SiluR*, *RAG2 PcR*, *RAG2 PrR* e *RAG2 PhF*) evidenciaram em todas os exemplares um fragmento controle de 521 pb. Além disso, os exemplares de *P. corruscans* apresentaram uma banda de 308 pb, enquanto os indivíduos de *P. reticulatum* um alelo de 277 pb e de *P. hemioliopterus* uma banda de 206 pb (Figuras 77 e 78). Já as amostras de “Pintapira” indicaram o perfil de 308 pb e 206 pb, enquanto os indivíduos de “Cachapira” foi observado o padrão de 277 pb e 206 pb.

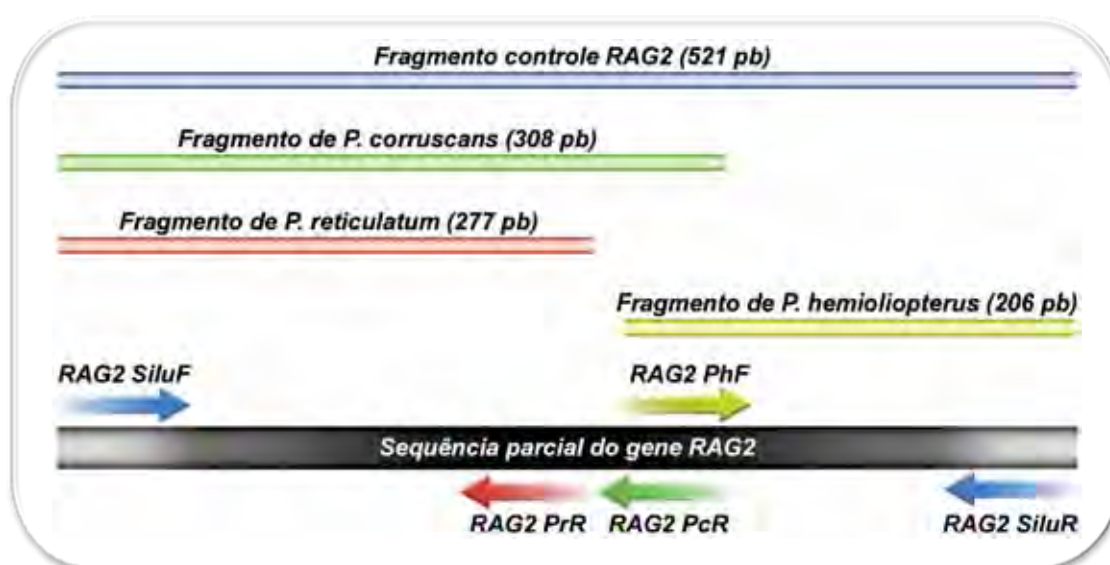


**Figura 77** - Sítios de reconhecimento e orientação dos primers universais e espécie-específicos das regiões amplificadas do gene nuclear RAG2.

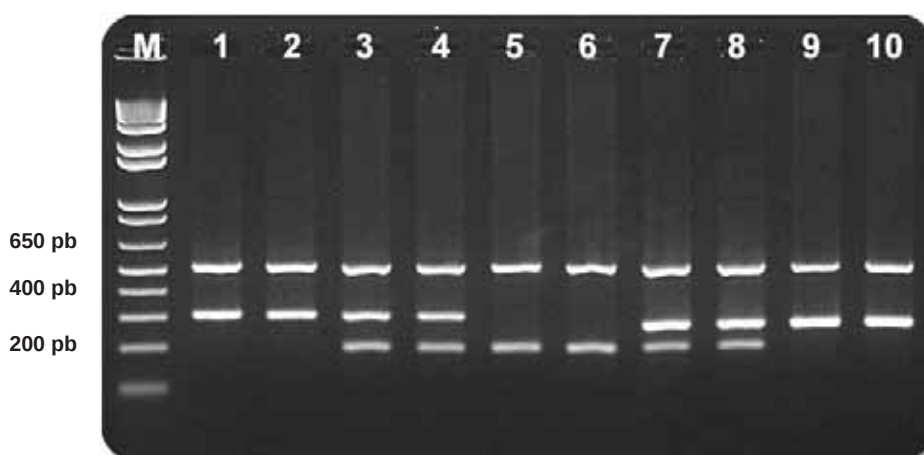


**Figura 78** - Gel de agarose da PCR-Multiplex do gene RAG2. *Pseudoplatystoma corruscans* (1-2), “Pintapira” (3-4), *Phractocephalus hemioliopterus* (5-6), “Cachapira” (7-8) e *P. reticulatum* (9-10). M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.4.4 Identificação molecular do lote de “Cachapira”

Inicialmente, com o intuito de caracterização do estoque de “Cachapira” da Piscicultura **B**, todas as amostras foram identificadas com os métodos de PCR-Multiplex e PCR-RFLP dos genes mitocondrial 16S e nuclear RAG2, estabelecidos no tópico **3.4.3**. Porém, através dos resultados obtidos com estes marcadores, tornou-se necessário a utilização dos genes nucleares GLOB, EF1 $\alpha$  e 18S, uma vez que surgiu a hipótese destes peixes serem resultado de linhagens pós-F1, provenientes do retrocruzamento envolvendo uma linhagem híbrida entre *P. reticulatum* e *P. corruscans*. Para estes genes, não há marcadores de PCR-Multiplex ou PCR-RFLP estabelecidos para a identificação da espécie *P. hemiliopterus*, sendo que o principal intuito foi apenas verificar se apresentava DNA de *P. reticulatum* ou *P. corruscans*. Em todas as reações Multiplex e PCR-RFLP realizados nesta fase de análise foram utilizadas amostras de DNA das espécies puras parentais, para servir como controle para a especificidade das reações.

Utilizando o marcador nuclear RAG2 (PCR-Multiplex) foram observados dois genótipos: 21 exemplares foram revelados com um genótipo de heterozigoto, com dois alelos de amplificação, de 206 pb e 277 pb, caracterizados para linhagens híbridas entre *P. reticulatum* e *P. hemiliopterus*; no entanto, 16 indivíduos também revelaram um padrão de heterozigoto, porém com os fragmentos específicos de 206 pb e 308 pb, que são caracterizados para híbridos entre *P. corruscans* e *P. hemiliopterus* (Figura 79). Em relação à análise do genoma mitocondrial, todas as amostras mostraram o fragmento gênico característico de *P. hemiliopterus* (Figura 79). A aplicação destes genes pela técnica de PCR-RFLP corroborou os resultados. Assim, os dados obtidos permitiram levantar à hipótese destes juvenis serem

resultantes de um retrocruzamento de uma linhagem híbrida entre *P. reticulatum* x *P. corruscans* com a espécie pura *P. hemioliopus*.

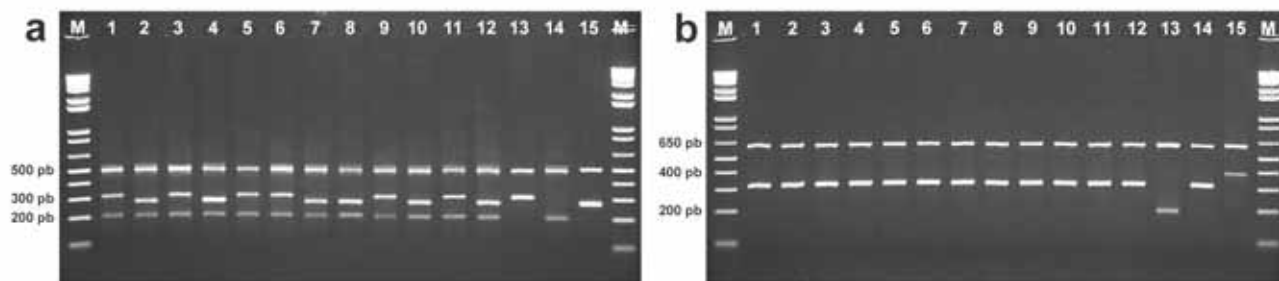


**Figura 79** – Padrões de identificação molecular do estoque de “Cachapira” da Piscicultura B. (a) e (b) são resultados de PCR-Multiplex dos genes nuclear RAG2 e mitocondrial 16S, respectivamente. Em (a), colunas 1, 3, 5, 6, 9 e 11 correspondem ao padrão de identificação de “Pintapira”; 2, 4, 7, 8, 10 e 12 o padrão de “Cachapira”. Em (b), colunas 1-12 mostram o padrão mitocondrial de *Phractocephalus hemioliopus*. Colunas 13, 14 e 15 são amostras de DNA das espécies puras *P. corruscans*, *Phractocephalus hemioliopus* e *P. reticulatum*, respectivamente, usadas como controle de amplificação; M, 1 Kb Plus DNA Ladder.

A aplicação de marcadores genéticos adicionais (GLOB, EF1 $\alpha$  e 18S), no sentido de verificar se estas amostras herdaram DNA da espécie *P. corruscans* ou de *P. reticulatum*, demonstrou a ocorrência de diferentes genótipos em um mesmo indivíduo, ou seja, em alguns marcadores uma mesma amostra revelava o fragmento específico de *P. reticulatum*, enquanto que por outros genes mostrava o DNA de *P. corruscans*, o que nitidamente evidenciou a presença de linhagens pós-F1 (Tabela 19). Assim, há grandes indícios que estas linhagens pós-F1 foram realizadas a partir de um retrocruzamento da espécie pura *P. hemioliopus* com a linhagem híbrida entre *P. reticulatum* x *P. corruscans*, pois os indivíduos deste cruzamento apresentavam tanto DNA da espécie *P. corruscans* quanto de *P. reticulatum*.

**Tabela 19** – Relação dos indivíduos de “Cachapira” da Piscicultura B e os respectivos genótipos de identificação molecular com os marcadores mitocondrial e nuclear. A sigla **Pr** significa *Pseudoplatystoma reticulatum*, **Pc** *P. corruscans* e **Ph** *Phractocephalus hemiliopterus*.

| Identificação | 16S |    |    | RAG2 |    |    | GLOB |    | EF1 $\alpha$ |    | 18S |    |
|---------------|-----|----|----|------|----|----|------|----|--------------|----|-----|----|
|               | Pr  | Ph | Pc | Pr   | Ph | Pc | Pr   | Pc | Pr           | Pc | Pr  | Pc |
| B145          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B146          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | X    | -  | -            | X  | X   | -  |
| B147          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | X            | -  | -   | X  |
| B148          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B149          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | X            | -  | -   | X  |
| B150          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | X    | -  | -            | X  | -   | X  |
| B151          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B152          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B153          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | X    | -  | -            | X  | -   | X  |
| B154          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B155          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B156          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B157          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | X            | -  | X   | -  |
| B158          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | X            | -  | X   | -  |
| B159          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B160          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | -            | X  | X   | -  |
| B161          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | X            | -  | -   | X  |
| B162          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B163          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | -            | X  | -   | X  |
| B164          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B165          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B166          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | X            | -  | X   | -  |
| B167          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B168          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B169          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | X            | -  | -   | X  |
| B170          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B171          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B172          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | -    | X  | X            | -  | -   | X  |
| B173          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | -            | X  | X   | -  |
| B174          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | -            | X  | X   | -  |
| B175          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | -            | X  | X   | -  |
| B176          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | X            | -  | -   | X  |
| B177          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | X    | -  | X            | -  | -   | X  |
| B178          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | X            | -  | X   | -  |
| B179          | -   | X  | -  | X    | X  | -  | X    | -  | -            | X  | X   | -  |
| B180          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | X    | -  | -            | X  | X   | -  |
| B181          | -   | X  | -  | -    | X  | X  | -    | X  | X            | -  | X   | -  |

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Marcadores de PCR-RFLP e PCR-Multiplex na identificação dos híbridos

Atualmente, a utilização de sequências de DNA na identificação de espécies tem se tornado uma metodologia extremamente eficiente. Tal fato é consolidado pelo uso crescente do DNA *barcode* (Hebert *et al.*, 2003; Ward, 2009), que consiste na utilização de um fragmento do gene Citocromo C Oxidase subunidade I (COI), como fonte de um sistema global de identificação para animais (Hebert *et al.*, 2003). Da mesma forma, os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que sequências de DNA podem apresentar grande eficácia e confiabilidade, mesmo utilizando diversos fragmentos gênicos, inclusive genes nucleares, cujos dados possibilitaram a perfeita identificação das espécies parentais e seus respectivos híbridos.

Neste estudo, a única abordagem utilizando o gene mitocondrial COI foi na diferenciação das espécies de Serrasalminidae. Porém, as análises evidenciaram uma baixa taxa de divergência genética para este gene na diferenciação das espécies de *Piaractus* (*P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*), cujo valor foi de 0.4%. Em comparação com um estudo de COI DNA *barcode* envolvendo 1088 espécies de peixes, o valor encontrado no presente estudo está bem abaixo da média para análises interespecíficas (congêneres), cujo valor correspondia a 8,39% (Ward, 2009). Além do mais, não foi possível identificar nucleotídeos diagnósticos para a distinção de *P. mesopotamicus*, o que não permitiu o estabelecimento do marcador de PCR-RFLP e dificultou a identificação de *P. mesopotamicus* por PCR-Multiplex, uma vez que o desenho de primers específicos para esta espécie não foi possível.

Portanto, foi utilizado o primer *COI PiaractusR*, que serviu como banda de amplificação controle nas reações Multiplex para *P. mesopotamicus*.

Tendo em vista que a identificação das espécies de *Piaractus* pelo marcador COI teve restrições, tornou-se necessário a utilização de um marcador mitocondrial adicional, o gene Citocromo B, que apresenta características apropriadas para análises de identificação molecular (Teletchea, 2009; Page e Hughes, 2010). Assim, o emprego deste gene permitiu o perfeito desenvolvimento do método de PCR-RFLP na diferenciação das espécies de *Piaractus*, entretanto, os nucleotídeos diagnósticos não foram suficientes para posicionar primers com alta especificidade.

Em relação à diferenciação das outras espécies pelo genoma mitocondrial, utilizou-se com sucesso o DNA ribossomal 16S. Nestes casos, a aplicação deste gene ocorreu principalmente por ser considerado um fragmento conservado do genoma mitocondrial, uma vez que em certos casos pode apresentar uma taxa de evolução molecular três vezes menor do que os genes COI ou CYTB (Knowlton e Weigt, 1998; Hebert *et al.*, 2003; Kochzius *et al.*, 2010), e desta forma evitar variações intra-específicas nas análises. O uso deste marcador na diferenciação das espécies de *Leporinus* e das espécies de Pimelodidae (*Pseudoplatystoma*, *Phractocephalus* e *Leiarius*) mostrou ser resolutivo tanto para o método de PCR-Multiplex quanto de PCR-RFLP. O gene mitocondrial 16S não foi utilizado para estabelecer marcadores para as espécies de Serrasalminidae, uma vez que as sequências gênicas não apresentaram divergência genética entre as espécies de *Piaractus*, ou seja, foram idênticas e sem a presença de nucleotídeos diagnósticos.

Apesar de algumas críticas, o DNA mitocondrial (DNAMt) tem sido o genoma mais comum em trabalhos sobre marcadores moleculares, pois apresentam uma série de considerações técnicas que facilitam sua utilização (Galtier *et al.*, 2009),

especialmente os genes COI, CTYB e 16S (Meyer, 1993; Teletchea, 2009; Kochzius *et al.*, 2010). Dentre estas características, destaca-se por ser muito menor que o genoma nuclear, existirem várias cópias do DNAm dentro da célula, modo de herança uniparental e presença de genes/regiões com diferentes taxas de substituição de base (Moritz *et al.*, 1987; Saccone *et al.*, 1999; Gissi *et al.*, 2008).

Devido à existência de primers robustos e universais, é relativamente fácil isolar fragmentos gênicos mitocondriais de forma rotineira (Kocher *et al.*, 1989; Palumbi, 1996; Ward *et al.*, 2005). Porém, se usado como única abordagem para a detecção de híbridos, pode resultar em erros de identificação. Como o DNAm em animais apresenta característica peculiar de herança materna (Moritz *et al.*, 1987), este tipo de marcador mostra aplicabilidade para detectar a direção do evento de hibridização e introgressão, bem como para diferenciação de híbridos recíprocos, pois caracteriza qual a linhagem materna que originou os híbridos. No presente estudo, a utilidade do DNAm fica evidente na distinção dos híbridos recíprocos “Pintachara” e “Cachapinta”, cujos resultados claramente revelam quais espécies foram utilizadas como linhagem materna nos cruzamentos.

Esta discriminação é indispensável, pois híbridos recíprocos podem demonstrar diferentes características zootécnicas e biológicas (Tave, 1993; Toledo-Filho *et al.*, 1998), principalmente híbridos envolvendo as espécies de Serrasalminidae (Fonteles, 2002). Em estudos anteriores, marcadores citogenéticos e bioquímicos não permitiram a diferenciação dos híbridos recíprocos “Tambacu” e “Paqui” (Almeida-Toledo *et al.*, 1987; Calcagnotto *et al.*, 1999), demonstrando a exclusiva aplicabilidade do DNAm, que suporta a direção do evento de hibridização.

Vários estudos na identificação de híbridos de peixes ocorre por métodos morfológicos e merísticos, ou pela utilização do DNAm, sem qualquer inferência a

partir de genes nucleares (Scribner *et al.*, 2001). Entretanto, os resultados são subestimados e não precisos, particularmente para estimar eventos de introgressão, em que se torna essencial o uso de vários *loci* nucleares (Docker *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2009). Por esta razão, devido ao fato de híbridos herdarem DNA nuclear de ambas às espécies parentais, somente por meio dos marcadores nucleares que os eventos de hibridação e introgressão podem ser detectados, como observado no presente estudo, através dos genótipos heterozigotos identificados nos produtos híbridos.

Entretanto, vários fatores dificultam a utilização de sequências gênicas nucleares e a enorme quantidade de genes contidos nos genomas nucleares não estão facilmente disponíveis. Para muitos grupos taxonômicos, os esforços para o estabelecimento de marcadores nucleares continuam a ser significativamente prejudicados pela falta de genes que forneçam resultados consistentes e de primers universais, o que determina grandes dificuldades técnicas e laboratoriais (Chen *et al.*, 2008). Por enquanto, não há um gene nuclear usado de forma universal para os peixes, pois para cada grupo de táxons são disponibilizados diferentes sequências gênicas nucleares. Desta forma, a escolha e obtenção de genes nucleares foi um grande obstáculo para o estabelecimento de marcadores na caracterização dos híbridos e os respectivos parentais do presente estudo.

Geralmente, usando primers previamente publicados para grupos específicos de peixes, ocorrem falhas na amplificação de fragmentos do gene nuclear, e muitas vezes com o surgimento de bandas múltiplas e inespecíficas (Friesen *et al.*, 1999; Mayden *et al.*, 2007), isto porque geralmente os sítios de anelamento dos primers não são conservados. Assim, para facilitação dos protocolos de PCR, no presente trabalho tornou-se necessário o desenho de primers mais específicos (RAG2

*SerraF*, *RAG2 SerraR*, *RAG2 SiluF*, *RAG2 SiluR*, *GLOB IpF*, *GLOB IpR*, *GLOB SiluF*, *GLOB SiluR* e *18S SiluR*) com base em sequências depositadas no GenBank, com exceção dos primers para amplificação dos genes TROP (Friesen *et al.*, 1999) e EF1 $\alpha$  (Moyer *et al.*, 2004). A disponibilidade de primers alternativos ou desenvolver primers mais específicos é extremamente importante para garantir a padronização de protocolos na amplificação de genes nucleares.

Inicialmente, para o estabelecimento de marcadores nucleares na identificação das espécies estudadas, as análises procederam-se com a aplicação do gene TROP, isolado através de primers universais que foram descritos em espécies de vertebrados (Friesen *et al.*, 1999). Porém, os fragmentos gênicos foram isolados apenas para as espécies de *Leporinus*, *Piaractus* e *Colossoma*, pois a amplificação gênica nos representantes da família Pimelodidae produziu múltiplas bandas, que pode ocorrer em alguns grupos taxonômicos (Friesen *et al.*, 1999).

Nos casos em que foi necessário a aplicação de outro marcador nuclear, foi escolhido o gene RAG2, já utilizado em estudos filogenéticos de vários grupos de peixes (Calcagnotto *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2006; Javonillo *et al.*, 2010; Cramer *et al.*, 2011), o que permitiu o desenho de primers mais específicos (*RAG2 SerraF*, *RAG2 SerraR*, *RAG2 SiluF* e *RAG2 SiluR*) facilitando a caracterização das técnicas de PCR-Multiplex e PCR-RFLP.

Considerando a fertilidade de híbridos entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* (J.A. Senhorini, comunicação pessoal), e como a aplicação de apenas um marcador nuclear não é suficiente para identificar linhagens pós-F1 (Boecklen e Howard, 1997), tornou-se extremamente necessário estabelecer marcadores nucleares adicionais na diferenciação destas espécies. Além da primeira geração de híbridos (F1), é muito mais complicado identificar um determinado indivíduo como híbrido,

uma vez que gerações pós-F1 podem ser confundidas como uma das espécies parentais submetidas à introgressão (Rhymer e Simberloff, 1996).

Por esta razão, foram obtidas sequências dos genes nucleares EF1 $\alpha$ , GLOB, e 18S. Estas sequências se mostraram como um significativo recurso para os métodos de identificação molecular, pois através destas foram estabelecidos os marcadores de PCR-Multiplex e PCR-RFLP na diferenciação das espécies de *Pseudoplatystoma* e seus híbridos, com exceção da aplicação da técnica de PCR-Multiplex para o gene 18S. Neste caso, não foi possível o desenho de primers espécie-específicos, pois as regiões adjacentes aos nucleotídeos diagnósticos não suportaram o posicionamento de primers.

Segundo Toledo-Filho *et al.* (1994), quando há retrocruzamentos de híbridos F1 com um dos parentais e são empregados quatro *loci* para diferenciação, a probabilidade de identificação destes animais como pertencentes à linhagens pós-F1 é de 87.5%. Por outro lado, se admitirmos um intercruzamento de linhagens híbridas F1, ou seja, F1 X F1, a probabilidade de identificar uma determinada amostra como pós-F1, através de quatro marcadores nucleares, é de aproximadamente 93%. Assim, a utilização dos quatro segmentos gênicos nucleares estabelecidos neste estudo, somado ao marcador mitocondrial, fornece uma significativa probabilidade para a identificação de um determinado indivíduo como pós-F1, como descritos em outros estudos (Boecklen e Howard, 1997; Docker *et al.*, 2003).

Na prática, existem várias técnicas como marcadores informativos na identificação de espécies. Na área de DNA forense, o principal método é o sequenciamento, seguida por análises das sequências de nucleotídeos. Neste caso, ocorre a comparação das sequências em estudo com sequências previamente obtidas de diferentes espécies, que podem estar depositados em bancos de dados

(Baker e Palumbi, 1994; Sanders *et al.*, 2008; Ogden *et al.*, 2009). No entanto, este método tem como desvantagens o alto custo para análise rotineira, bem como não pode ser facilmente analisado para a detecção dos genótipos heterozigotos de híbridos. Em contraste, as técnicas utilizadas neste estudo se mostraram ideais para a detecção de híbridos, uma vez que são mais fáceis de realizar e menos onerosas do que o sequenciamento de DNA e análise da sequência de nucleotídeos.

A grande vantagem da técnica de PCR-Multiplex em relação à de PCR-RFLP é que a primeira não requer passos adicionais de restrição enzimática, eliminando assim quaisquer análises pós-PCR, inclusive tempo e custos associados. Em contraste, há limitações em relação ao desenho dos primers, principalmente visando uma boa especificidade e eficácia. É necessário escolher primers com temperaturas de anelamento similares, evitar a formação de estruturas secundárias e também desenvolver primers que produzam fragmentos de tamanhos diferentes e facilmente distinguíveis (Pank *et al.*, 2001; Marshall *et al.*, 2007).

As estratégias de PCR-Multiplex e PCR-RFLP mostraram ser eficientes metodologias, de rápida execução e baixo custo, por permitirem análises através de uma simples reação de PCR e em algumas situações suportadas por apenas um nucleotídeo diagnóstico. Consequentemente, estas técnicas poderão facilitar a implantação rotineira do monitoramento genético de híbridos nas pisciculturas, permitindo o correto manejo dos estoques naturais e cultivados de peixes.

#### **4.2 Identificação molecular dos lotes comprados de pisciculturas**

De uma forma alarmante, os dados de identificação molecular dos estoques deste estudo mostram que a produção, manejo e comércio de peixes, em especial

de híbridos, são realizados de forma descontrolada nas pisciculturas brasileiras. Durante este trabalho, através de contatos feitos com vários produtores do Brasil, foi observado que a maioria dos piscicultores produz apenas produtos híbridos, e somente alguns produzem espécies nativas. O cultivo de híbridos já se tornou uma prática consolidada pelas pisciculturas brasileiras, no entanto, sem qualquer tipo de monitoramento. Tal procedimento é agravado pelo fato de peixes serem comercializados pelos piscicultores principalmente quando são juvenis, cuja fase é muito difícil para identificação morfológica (Porto-Foresti *et al.*, 2010).

Nestes casos, métodos moleculares fornecem ferramentas essenciais para estabelecer diferenças entre espécies em situações que a identificação morfológica é impossível ou difícil, até mesmo para produtos que foram processados antes da venda (Clarke *et al.*, 2006; Palumbi, 2007), permitindo a identificação exata das espécies exploradas, como no presente estudo. O principal propósito é fornecer informações sobre a dinâmica da exploração comercial de espécies ameaçadas ou que ameaçam o ambiente, e uma estimativa do volume deste comércio para a certificação dos dados oficiais (Baker, 2008).

As abordagens genéticas estabelecidas neste estudo fornecem subsídios confiáveis para um monitoramento adequado do comércio de exemplares híbridos. O clássico exemplo em que recursos genéticos foram aplicados com finalidade de identificação molecular é o comércio ilegal de carne de baleia protegida nos mercados do Japão e Coreia do Sul (Baker e Palumbi, 1994; Baker *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 2010). Atualmente, podem ser utilizados em diversos outros grupos de organismos cuja identificação morfológica é impraticável, tais como de cavalos-marinhos (Sanders *et al.*, 2008), barbatanas de tubarão (Mendonça *et al.*, 2010), pinípedes (Malik *et al.*, 1997), caviar (DeSalle e Birstein, 1996), chifres de

rinocerontes (Hsieh *et al.*, 2003), entre outros.

A rotulagem inadequada dos produtos oriundos da pesca ou caça pode mascarar fontes de exploração ilegal e não regulamentada, gerando ameaças às espécies protegidas (Marko *et al.*, 2004), como descrito nos resultados deste estudo para o comércio indiscriminado de peixes híbridos. Para a grande parcela do comércio de espécies com rotulagem inadequada, as pesquisas moleculares fornecem uma abordagem empírica para o monitoramento e avaliação da diversidade de espécies e volume do mercado (Baker, 2008), incluindo espécies que são exploradas ilegalmente ou de forma não regulamentada.

No Brasil, a maioria dos estabelecimentos de aquicultura não é licenciada e há poucas regulamentações legais sobre a produção aquícola (Suplicy, 2007). Em alguns Estados, tais como o Mato Grosso e Amapá, a legislação sobre a atividade da piscicultura revela preocupações com o meio ambiente, particularmente com a produção de híbridos, que deverá ocorrer em laboratórios devidamente licenciados, acompanhados do laudo de inspeção sanitária por órgãos competentes, além de alguns critérios destinados à produção de alevinos que devem ser seguidos.

Entretanto, geralmente estas normas não são adotadas, pois há falta de um sistema de identificação e autenticidade a ser adotado pelas pisciculturas, além da ausência de fiscalização pelos órgãos competentes. Ao comprarem espécies naturais, os consumidores podem estar adquirindo de forma não discriminada exemplares híbridos, o que causará sérios prejuízos em seus empreendimentos e para o meio ambiente. Estes problemas podem ser solucionados com a aplicação dos marcadores obtidos neste trabalho, que apresentam as vantagens de rápida execução e baixo custo, permitindo o uso rotineiro.

#### 4.2.1 Identificação molecular dos estoques de Piaçu

Os exemplares comprados como *Leporinus macrocephalus* (Piaçu) corresponderam ao único grupo analisado no presente estudo que não teve problemas com a comercialização errônea de híbridos. Nas quatro pisciculturas em que foram realizadas as identificações moleculares, verificou-se que todos os lotes desta espécie foram vendidos de forma correta e correspondiam ao comercializado. Possivelmente, apesar da possibilidade de produção de híbridos a partir do cruzamento interespecífico entre *L. macrocephalus* e *L. elongatus*, os resultados da identificação molecular revelaram que ainda não há uma tendência na produção de híbridos envolvendo estas espécies, visto que em nenhuma piscicultura foi constatada tais linhagens.

#### 4.2.2 Identificação molecular de lotes dos peixes serrasalmídeos

A identificação molecular dos lotes de juvenis da família Serrasalminidae evidencia que estes são produzidos, comercializados e manejados erroneamente. Nos estoques comprados da Piscicultura **B** observou-se uma grande heterogeneidade de produtos, em especial, nas amostras de “Tambacu” e “Patinga”, em que até cinco diferentes produtos foram detectados dentro de um único lote, incluindo a presença de espécies nativas em conjunto com linhagens híbridas. Os resultados indicam que estes animais podem estar sendo manejados incorretamente nos sistemas de cultivo, provavelmente porque o produtor não separa as espécies puras e produtos híbridos em locais adequados e diferenciados, de modo que os juvenis de diferentes linhagens são misturados no mesmo ambiente. Consequentemente, a comercialização destes animais torna-se toda prejudicada, pois diferentes peixes são vendidos misturados como um único produto.

Da mesma forma, os juvenis dos lotes de *Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus* da Piscicultura **D**, e dos estoques de *C. macropomum* e “Tambatinga” da Piscicultura **F**, foram comercializados de forma inadequada, pois eram compostos apenas por híbridos “Tambacu”. Os produtores vendem lotes rotulados incorretamente com a finalidade de gerar um atrativo e agregar um valor artificial para o produto, enganando o consumidor, como é realizado na comercialização de várias espécies de peixes (Hsieh *et al.*, 2007; Gil, 2007; Lowenstein *et al.*, 2009).

Especial atenção deve ser dada aos estoques comprados como espécies puras de *C. macropomum* e *P. mesopotamicus* da Piscicultura **D**, pois quando híbridos são vendidos falsamente no lugar de espécies puras há uma preocupação maior, pois mostra que o comércio destes animais está ocorrendo de forma descontrolada, sem consciência dos riscos ambientais e biológicos que estes animais representam, cujos impactos certamente ameaçarão a indústria da aquicultura e as espécies nativas, como têm sido descrito para várias outras espécies, tais como tilápia, bagres e trutas (Bartley e Gall, 1991; Docker *et al.*, 2003; Na-Nakorn *et al.*, 2004; Angienda *et al.*, 2011).

A grande maioria de pisciculturas brasileiras que comercializam juvenis de peixes serrasalmídeos tem produzido preferencialmente o híbrido “Tambacu” (Suplicy, 2007). Isto porque a tecnologia de reprodução por meio de indução hormonal é bem estabelecida para estes híbridos e amplamente difundida nos sistemas de cultivo, o que torna a criação mais fácil em relação aos outros híbridos e até mesmo em consideração as espécies puras, e podem justificar o fato de pisciculturas venderem de forma não discriminada híbridos “Tambacu” como outros produtos. Em algumas regiões brasileiras, a linhagem híbrida “Tambacu” é

produzida mais do que as espécies parentais puras, como ocorre no Centro-Oeste do país, cuja produção de “Tambacu” chega a 8.359 toneladas, enquanto a produção das espécies *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* alcançam 7.953 e 6.645 toneladas, respectivamente (IBAMA, 2007).

#### 4.2.3 Identificação de híbridos pós-F1 em lotes de peixes serrasalmídeos

Com riscos ainda mais significativos, os dados da identificação molecular para os lotes de serrasalmídeos evidenciaram a ocorrência de linhagens pós-F1, oriundas de retrocruzamentos utilizando uma fêmea da linhagem híbrida “Patinga” com as espécies puras *C. macropomum* ou *P. brachypomus*, e vendidas erroneamente como lotes de “Patinga”. Tal situação foi detectada em duas pisciculturas independentes e demonstra que esta prática pode estar ocorrendo em várias estações de cultivo.

Os resultados da caracterização molecular utilizando genes nucleares e mitocondriais forneceram claras evidências para admitir que indivíduos da linhagem híbrida “Patinga” possuem fertilidade e, atualmente, estão sendo utilizados como matrizes nas pisciculturas brasileiras, o que pode gerar sérios riscos de contaminação genética, como reportado para espécies de tilápias e carpas (Pullin, 1988; Mia *et al.*, 2005). Conhecida a fertilidade do híbrido “Patinga” e a viabilidade de retrocruzamentos, torna-se imprescindível a aquisição adicional de novos marcadores com base em genes nucleares, pois permitirá a identificação de indivíduos pertencentes às linhagens pós-F1 com maior confiabilidade.

Além do mais, o evento de retrocruzamento foi ratificado pelos resultados das metodologias citogenéticas, permitindo explicar a procedência do atípico genótipo E. Em estudos anteriores, indivíduos das espécies *C. macropomum*, *P. mesopotamicus*

e *P. brachypomus* foram caracterizados com números diplóides compostos por 54 cromossomos, de morfologias meta e submetacêntricos (Almeida-Toledo *et al.*, 1987; Nirchio *et al.*, 2003). Assim, de forma esperada, os indivíduos analisados citogeneticamente neste estudo também revelaram  $2n = 54$  cromossomos, com exceção do exemplar de genótipo E caracterizado como triplóide ( $3n$ ), que foi originado a partir da retenção do segundo corpúsculo polar.

De acordo com Almeida-Toledo *et al.* (1987), um híbrido da linhagem de “Tambacu” também foi identificado cromossomicamente como indivíduo triplóide e, por isso, os métodos citogenéticos correspondem a recursos bem apropriados para se verificar tanto os níveis de ploidia como a origem dos conjuntos cromossômicos dos parentais nos produtos híbridos (Toledo-Filho *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.* 2009a). Em relação ao fenômeno de retenção do segundo corpúsculo polar, situação similar também foi descrito em exemplares pós-F1 do retrocruzamento entre fêmea de *P. mesopotamicus* e macho do híbrido “Tambacu”, porém, neste caso originando indivíduos ginogenéticos (Almeida-Toledo *et al.*, 1996).

Na tentativa de identificar a origem de cromossomos específicos dos parentais nos híbridos, a localização de clusters do DNA ribossomal 5S permitiu mostrar diferentes cromossomos portadores de sítios ribossomais, que não foram considerados cromossomos homólogos devido a diferentes morfologias e/ou tamanhos. Similarmente aos resultados obtidos neste estudo, a presença de clusters de DNAr 5S em dois pares de cromossomos em indivíduos diplóides tem sido frequente em genomas de peixes (Martins e Wasko, 2004; Hashimoto *et al.*, 2011). Entretanto, quando se evidencia que estes cromossomos são não-homólogos, há forte evidência de que são cromossomos originados de diferentes espécies e,

consequentemente, não pareiam nos genomas dos híbridos, como reportado em outros estudos (Porto-Foresti *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2009b).

Além da “Patinga”, cuja fertilidade está bem evidente por meio dos resultados genéticos aqui obtidos, híbridos de “Tambacu” e “Tambatinga” já mostraram apresentar fertilidade, apesar de serem em baixas taxas, podendo retrocruzar com uma das espécies parentais (Almeida-Toledo *et al.*, 1996; Martino, 2002). Nestes casos, é possível prever em curto prazo os potenciais riscos genéticos, pois híbridos podem provocar contaminação genética, ou ainda, na prole pós-F1 pode ocorrer a “diluição” ou “perda” de características desejáveis originadas pelo vigor do híbrido (Toledo-Filho *et al.*, 1994), além da baixa taxa de eclosão e alto nível de mortalidade (Almeida-Toledo *et al.*, 1996), que causarão prejuízos aos produtores.

Já em consideração aos estoques selvagens, se soltos na natureza ou se liberados nos rios devido a escapes acidentais, poderão se intercruzar ou retrocruzar livremente com as espécies selvagens e através de homogeneização genética, em longo prazo, resultará numa única população híbrida decorrente da hibridação introgressiva, colocando em risco as espécies nativas, como têm ocorrido com espécies de trutas, tilápias e esturjões (Toledo-Filho *et al.*, 1994).

Há uma série de levantamentos de peixes e informações pessoais fornecidos pelos pescadores que relatam a ocorrência de peixes híbridos serrasalmídeos vivendo em simpatria com as espécies puras em rios brasileiros (Orsi e Agostinho, 1999; Paiva *et al.*, 2002). Estes eventos são provavelmente ocorridos por escapes de pisciculturas, uma vez que os híbridos naturais, especialmente “Tambacu” e “Patinga”, não pode ocorrer naquelas localidades devido à distribuição geográfica das espécies nativas. A espécie *P. mesopotamicus* é distribuída na bacia Paraná-Paraguai, enquanto *P. brachypomus* e *C. macropomum* são amplamente

distribuídas na bacia amazônica (Jégu, 2003). A introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de instalações de aquicultura é muito comum e pode ser atribuído à ocupação ilegal das margens do rio, o descumprimento das medidas padronizadas para evitar escapes e a falta de consciência ambiental por parte dos piscicultores (Orsi e Agostinho, 1999).

#### **4.2.4 Identificação molecular de lotes dos peixes pimelodídeos**

Enfim, em relação aos resultados da identificação molecular dos peixes da família Pimelodidae, foi constatado que estes também são produzidos, comercializados e manejados de maneira descontrolada. Nas três pisciculturas em que foram comprados exemplares de lotes rotulados como Pintado, verificou-se que 100% dos juvenis correspondiam aos híbridos “Cachapinta”, entre fêmea de *Pseudoplatystoma reticulatum* e macho de *P. corruscans*. Possivelmente, existe uma preferência por parte dos piscicultores na produção deste híbrido ao invés da espécie pura, tanto por possíveis vantagens zootécnicas (Crepaldi *et al.*, 2006), como por facilidades de obter desovas das fêmeas da Cachara (*P. reticulatum*) durante um período mais longo do ano (Campos, 2010). Tal prática, realizada sem monitoramento, justifica a precária estatística sobre a produção e comercialização destes híbridos, que provavelmente são vendidos como Pintado porque é a espécie mais popular para os consumidores.

Adicionalmente, estes híbridos são férteis e podem retrocruzar com seus parentais (J.A. Senhorini, comunicação pessoal), demonstrando que a comercialização e manejo de híbridos “Cachapinta” necessitam receber uma atenção especial, principalmente pela ameaça que representam às populações naturais e por serem vendidos comercialmente como uma das espécies parentais.

Contudo, através da identificação molecular dos estoques comercializados como “Cachandiá” e “Cachapira”, que ficou evidenciado a relevante problemática envolvendo a fertilidade dos híbridos “Cachapinta”. Com exceção dos exemplares de “Cachandiá” da Piscicultura **G**, cujas análises mostraram que foram vendidos de acordo com o especificado, verificou-se que os outros estoques eram resultantes de linhagens pós-F1, em que híbridos “Cachapinta” foram utilizados como matrizes em retrocruzamentos com *Leiarius marmoratus* e *Phractocephalus hemioliopterus*. Assim, similarmente à situação dos híbridos “Patinga”, considera-se que os híbridos “Cachapinta” representam potenciais riscos genéticos, ameaçando a integridade genética das espécies puras, conforme descrito por Toledo-Filho *et al.* (1994).

#### **4.2.5 Identificação molecular de um plantel de matrizes de Pintado e Cachara**

Por fim, nas análises de aconselhamento genético fornecido a uma piscicultura do Estado de SP ficou evidente a atual situação sobre como linhagens híbridas entre espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum* estão sendo manejadas inadequadamente como matrizes nas pisciculturas brasileiras. De acordo com os resultados, os indivíduos que compõem o plantel de reprodutores são em sua maioria híbridos, demonstrando que a fertilidade destes animais podem seriamente comprometer estoques cultivados, conforme foi observado em estoques contendo carpas híbridas como matrizes (Mia *et al.*, 2005).

A preocupação ainda é maior porque o plantel de matrizes desta piscicultura está composto por mais de 50% de indivíduos híbridos pós-F1, o que pode gerar grandes prejuízos neste empreendimento, uma vez que cruzamentos de linhagens pós-F1 geram uma prole de pouca viabilidade e com alta mortalidade (Almeida-Toledo *et al.*, 1996). Assim, o produtor foi aconselhado a evitar os retrocruzamentos

ou intercruzamentos e descartar as matrizes híbridas, especialmente aquelas cujos padrões de identificação molecular revelaram ser de linhagens pós-F1, além da orientação para refazer seu plantel de reprodutores com espécies puras.

Outro fato interessante foi à comparação dos resultados da identificação morfológica realizada pelo piscicultor com os dados gerados pela identificação molecular. De acordo com as informações do piscicultor, o lote de matrizes analisadas apresentava sete Pintados, porém, de forma alarmante, pelos resultados da identificação molecular somente um exemplar foi caracterizado como Pintado puro. Consequentemente, as análises demonstraram que a simples caracterização morfológica, mesmo de indivíduos adultos, não pode ser considerada confiável (Mallet, 2005; Baumsteiger *et al.*, 2005), uma vez que linhagens híbridas, especialmente pós-F1, podem ser identificadas como espécies puras e utilizadas como reprodutores.

Do ponto de vista ambiental e da conservação, a problemática ainda é considerada de proporções maiores, uma vez que nestes casos ações mitigadoras para reverter à situação são extremamente difíceis (Genovart, 2009; Britton *et al.*, 2010). Isto porque híbridos entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* têm sido frequentemente relatado e detectado em ambientes naturais. O caso que merece atenção especial é do rio Mogi Guaçu, relatado por Prado (2010). Historicamente, na ictiofauna deste rio só havia ocorrência da espécie *P. corruscans*. Entretanto, nos últimos anos começaram a ser coletados indivíduos com padrão morfológico de *P. reticulatum*, que após análises moleculares foram identificados como híbridos entre estas espécies. Provavelmente, estes eram oriundos de escapes de pisciculturas, uma vez que a hibridação natural não poderia ocorrer pela ausência da espécie *P. reticulatum* no rio Mogi Guaçu. Em recentes coletas, está cada vez mais rara a

captura de exemplares puros de *P. corruscans* (J.A. Senhorini, comunicação pessoal), o que fornecem indícios de que estes animais estão sofrendo retrocruzamentos com os híbridos, e através da introgressão genética podem levar esta população de *P. corruscans* à extinção.

Assim, é necessário o desenvolvimento de uma política de conscientização ambiental atingindo como público-alvo os produtores e criadores de peixes, principalmente com intuito de mostrar os aspectos negativos que híbridos podem apresentar, caso sejam manejados e comercializados erroneamente (Toledo-Filho *et al.*, 1994). Torna-se essencial a discussão sobre a questão da fertilidade dos híbridos, que além de impactarem negativamente as populações naturais, se utilizados como matrizes poderão causar prejuízos financeiros aos próprios produtores.

Uma vez que produtores não investem em coletas de matrizes puras obtidas no ambiente natural devido ao alto capital de investimento, a tendência é de cada vez mais serem utilizadas matrizes híbridas. Isto porque os plantéis de reprodutores são formados por exemplares oriundos de outras pisciculturas, que geralmente fornecem exemplares híbridos. A questão do uso de matrizes híbridas deve ser discutida através de políticas públicas, uma vez que isto ocorre principalmente devido à falta de investimento em um programa sistematizado de melhoramento genético e ausência de subsídios para obtenção de matrizes puras, cuja tendência é agravar, uma vez que híbridos estão sendo soltos nos rios e contaminando os estoques naturais.

## 5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho, é possível destacar uma série de conclusões, que demonstram a importância da aplicação de marcadores moleculares no monitoramento genético dos programas de hibridação interespecífica em pisciculturas brasileiras, apresentados na forma de tópicos a seguir:

- ✓ os marcadores de PCR-Multiplex e PCR-RFLP caracterizados neste estudo se mostraram de grande eficiência para a diferenciação das espécies parentais e os respectivos híbridos;
- ✓ a aplicação destes métodos para o monitoramento genético torna-se imprescindível, principalmente por serem técnicas rápidas e de baixo custo, que podem ser utilizadas rotineiramente;
- ✓ estes métodos podem fornecer proteção aos consumidores contra o comércio e manejo descontrolado de híbridos na indústria da aquicultura;
- ✓ os marcadores estabelecidos permitirão, junto aos órgãos competentes, o delineamento de planos de conservação para um manejo correto destes animais, de forma a minimizar os impactos negativos aludidos com a implementação de projetos de hibridação;
- ✓ ainda devem ser estabelecidos marcadores moleculares adicionais com base em genes nucleares, permitindo com uma maior confiabilidade a identificação de linhagens híbridas pós-F1 de “Patinga” e “Cachapinta”;
- ✓ os resultados obtidos através da identificação molecular dos estoques demonstram que a produção e comercialização de híbridos estão crescendo de forma descontrolada e sem monitoramento em pisciculturas do Brasil;

- ✓ atenção imediata deve ser direcionada para um manejo adequado dos híbridos entre espécies da família Serrasalminidae e Pimelodidae, especialmente das linhagens férteis “Patinga” e “Cachapinta”;
- ✓ é necessário um programa organizado de melhoramento genético com a finalidade de fornecimento de matrizes puras para as pisciculturas brasileiras, evitando o manejo inadequado de matrizes híbridas;
- ✓ o monitoramento genético desempenha um papel significativo no desenvolvimento sustentável da aquicultura, aliando o desenvolvimento de bases tecnológicas com a conservação ambiental.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho AA e Julio Jr HF (1996) Ameaça ecológica: peixes de outras águas. *Ciê. Cult.*, 21(134): 36-44.
- Allendorf FW e Leary RF (1988) Conservation and distribution of genetic variation in a polytypic species: the cutthroat trout. *Conserv. Biol.*, 2: 170-184.
- Allendorf FW e Waples RS (1996) Conservation and genetics of salmonid fishes. In: Avise JC e Hamrick JL (eds.), *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, USA, 238-280.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P e Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.*, 16(11): 613-622.
- Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA, Bernardino G, Ferrari VA e Alcantara RCG (1987) Cytogenetic studies in *Colossoma mitrei*, *C. macropomum* and their interspecific hybrid. In: Tiews K (ed.), *Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*. Berlin Heenemann Verlagsgesellschaft mbH vol. 1, 189-195.
- Almeida-Toledo LF, Bigoni APV, Bernardino G e Toledo-Filho SA (1995) Chromosomal location of NORs and C bands in F1 hybrids of bighead carp and silver carp reared in Brazil. *Aquaculture*, 135: 277-284.
- Almeida-Toledo LF, Bernardino G, Oliveira C, Foresti F e Toledo-Filho SA (1996) Gynogenetic fish produced by a backcross involving a male hybrid (female *Colossoma macropomum* x male *Piaractus mesopotamicus*) and a female *Piaractus mesopotamicus*. *Bol. Tec. CEPTA*, 9: 31-37.
- Angienda PO, Lee HJ, Elmer KR, Abila R, Waindi EM e Meyer A (2011) Genetic structure and gene flow in an endangered native tilapia fish (*Oreochromis esculentus*) compared to invasive Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Yala swamp, East Africa. *Conserv. Genet.*, 12: 243-255.
- Araújo-Lima CARM e Ruffino ML (2003) Migratory fishes of the Brazilian Amazon. In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C e Baer A (eds.), *Migratory fishes of South America*. Victoria, BC, Canada: World Fisheries Trust, 232-302.
- Baker CS e Palumbi SR (1994) Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*, 265: 1538–1539.
- Baker CS, Cipriano F e Palumbi SR (1996) Molecular genetic identification of whale

- and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Mol. Ecol.*, 5: 671–685.
- Baker CS (2008) A truer measure of the market: the molecular ecology of fisheries and wildlife trade. *Mol. Ecol.*, 17: 3985–3998.
- Baker CS, Steel D, Choi Y, Lee H, Kim KS, Choi SK, Ma YU, Hambleton C, Psihoyos L, Brownell RL e Funahashi N (2010) Genetic evidence of illegal trade in protected whales links Japan with the US and South Korea. *Biol. Lett.*, doi: 10.1098/rsbl.2010.0239.
- Bartley DM e Gall AE (1991) Genetic identification of native cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*) and introgressive hybridization with introduced rainbow trout (*O. mykiss*) in streams associated with the Alvord Basin, Oregon and Nevada. *Copeia*, 3: 854-859.
- Bartley DM, Rana K e Immink AJ (2001) The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 325-337.
- Baumsteiger J, Hankin D e Loudenslager EJ (2005) Genetic analyses of juvenile steelhead, coastal cutthroat trout, and their hybrids differ substantially from field identifications. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 134: 829-840.
- Boecklen WJ e Howard DJ (1997) Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, 78(8): 2611-2616.
- Britton JR, Gozlan RE e Copp GH (2010) Managing non-native fish in the environment. *Fish Fish.*, DOI: 10.1111/j.1467-2979.2010.00390.x.
- Buitrago-Suárez UA e Burr BM (2007) Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512: 1-38.
- Burpo FJ (2001) A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. *Biochemistry*, 218: 1-11.
- Calcagnotto D, Almeida-Toledo LF, Bernardino G e Toledo-Filho SA (1999) Biochemical genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. *Aquaculture*, 174: 51-57.
- Calcagnotto D, Schaefer SA e DeSalle R (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36: 135-153.
- Campos JL (2010) O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix;

- Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: Baldisserotto B e Gomes LC (eds.), *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 335-361.
- Campton DE (1987) Natural hybridization and introgression in fishes: Methods of detection and genetic interpretations. In: Ryman N e Utter F (eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle, USA, 161-192.
- Carvalho-Costa LF, Piorski NM, Willis SC, Galetti Jr. PM e Ortí G (2011) Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Mol. Phylogenet. Evol.*, doi:10.1016/j.ympev.2011.02.005.
- Chapman DD, Abercrombie DL, Douady CJ, Pikitch EK, Stanhope MJ e Shivji MS (2003) A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: Application to global conservation and trade monitoring of the greatwhite shark, *Carcharodon carcharias*. *Conserv. Genet.*, 4: 415-425.
- Chen WJ, Miya M, Saitoh K e Mayden RL (2008) Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing Tree of Life of ray-finned fishes: The order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study. *Gene*, 423: 125-134.
- Clarke SC, Magnussen JE, Abercrombie DL, Mcallister MK e Shivji MS (2006) Identification of shark species composition and proportion in the Hong Kong shark fin market based on molecular genetics and trade records. *Conserv. Biol.*, 20: 201-211.
- Cramer CA, Bonatto SL e Reis RE (2011) Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 59: 43-52.
- Crepaldi DV, Faria PMC, Teixeira EA, et al. (2006) O surubim na aquacultura do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 30: 150-158.
- De-Franco B, Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C e Foresti F (2010) Forensic identification of the guitarfish species *Rhinobatos horkelli*, *R. percellens* and *Zapteryx brevirostris* using multiplex-PCR. *Mol. Ecol. Res.*, 10: 197-199.
- DeSalle R e Birstein VJ (1996) PRC identification of black caviar. *Nature*, 381: 197-198.

- Docker MF, Dale A e Heath DD (2003) Erosion of interspecific reproductive barriers resulting from hatchery supplementation of rainbow trout sympatric with cutthroat trout. *Mol. Ecol.*, 12: 3515-3521.
- FAO (2000) The State of World Fisheries and Aquaculture - 2000 (SOFIA). *Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO Fisheries and Aquaculture Department*, Roma.
- FAO (2010) The State of World Fisheries and Aquaculture - 2010 (SOFIA). *Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO Fisheries and Aquaculture Department*, Roma.
- Fernandes R, Gomes LC e Agostinho AA (2003) Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, 25(1): 115-120.
- Ferraris Jr. CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.
- Fonteles SBA (2002) Caracterização genética de híbridos utilizados na piscicultura brasileira. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP.
- Fonteles SBA, Fernandes FMC, Lopes CE, Kulikoski R, Kulikoski J e Almeida-Toledo LF (2005) Molecular markers in Chinese carps and their interspecific hybrids. *Genet. Mol. Biol.*, 28: 172-174.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF e Toledo-Filho SA (1981) Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 31: 137-144.
- Foresti F (2000) Biotechnology and fish culture. *Hydrobiologia*, 420: 45-47.
- Friesen VL, Congdon BC, Kidd MG e Birt TP (1999) Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. *Mol. Ecol.*, 8: 2141-2152.
- Galtier N, Nabholz B, Glémin S e Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.*, 18: 4541-4550.
- Garavello JC e Britski A (2003) Family Anostomidae (Headstanders). In: Reis RE, Kullander SO e Ferraris Jr. CJ (eds.) *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 71-84.
- Genovart M (2009) Natural hybridization and conservation. *Biodivers. Conserv.*, 18: 1435-1439.
- Gil LA (2007) PCR-based methods for fish and fishery products authentication.

- Trends Food Sci. Technol.*, 18: 558-566.
- Gissi C, Iannelli F e Pesole G (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101: 301-320.
- Gomes LC, Simões LN e Araujo-Lima CARM (2010) Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto B e Gomes LC (eds.), *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 589-606.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hashimoto DT, Parise-Maltempi PP, Laudicina A, Bortolozzi J, Senhorini JA, Foresti F e Porto-Foresti F (2009a) Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytogenet. Genome Res.*, 124: 151-157.
- Hashimoto DT, Laudicina A, Bortolozzi J, Foresti F e Porto-Foresti F (2009b) Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Genetica*, 137: 135-140.
- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W; Foresti F e Porto-Foresti F (2011) Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenet. Genome Res.*, 134: 64-71.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL e Ward JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B*, 270: 313-322.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH e Vogt PH (1997) Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23: 504-511.
- Hsieh HM, Huang LH, Tsai LC, Kuo YC, Meng HH, Linacre A e Lee JCI (2003) Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. *Forensic Sci. Int.*, 136: 1-11.
- Hsieh HS, Chai T e Hwang DF (2007) Using the PCR–RFLP method to identify the species of different processed products of billfish meats. *Food Control*, 18: 369-374.
- Hulata G (1995) The history and current status of aquaculture genetics in Israel.

- Israeli J. *Aquaculture-Bamidgeh*, 47: 142-154.
- Hulata G (2001) Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111: 155-173.
- IBAMA (2007) Estatística da Pesca 2007: Brasil – Grandes regiões e unidades da Federação. 113 pp.
- Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH e Burns JR (2010) Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 54: 498-511.
- Jégu M (2003) Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). In: Reis RE, Kullander SO e Ferraris CJ (eds.), Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 182-196.
- Knowlton N e Weigt LA (1998) New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 2257-2263.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX e Wilson A (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 6196-6200.
- Kochzius M, Seidel C, Antoniou A, et al. (2010) Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLoS ONE*, 5: 1-15.
- Levan A, Fredga K e Sandbreg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lowenstein JH, Amato G e Kolokotronis SO (2009) The Real *maccoyii*: Identifying Tuna Sushi with DNA Barcodes – Contrasting Characteristic Attributes and Genetic Distances. *PLoS ONE*, 4: 1-14
- Lundberg JG e Littmann MW (2003) Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis RE Kullander SO e Ferraris Jr. CJ (eds.), *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, 432-446.
- Mair GC (2007) Genetics and breeding in seed supply for inland aquaculture. In: Bondad-Reantaso MG (ed.), *Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 501. FAO, Rome, 519-548.
- Malik S, Wilson PJ, Smith RJ, Lavigne DM e White BN (1997) Pinniped penises in trade: a molecular genetic investigation. *Conserv. Biol.*, 11: 1365-1374.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.*, 20: 229-237

- Marko PB, Lee SC, Rice AM, Gramling JM, Fitzhenry TM, McAlister JS, Harper GR e Moran AL (2004) Fisheries: mislabelling of a depleted reef fish. *Nature*, 430: 309-310.
- Markoulatos P, Siafakas N e Moncany M (2002) Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *J. Clinical Lab. Analysis*, 16: 47-51.
- Marshall HD, Johnstone KA e Carr SM (2007) Species-specific oligonucleotides and multiplex PCR for forensic discrimination of two species of scallops, *Placopecten magellanicus* and *Chlamys islandica*. *Forensic Sci. Int.*, 167: 1-7.
- Martino G (2002) Retrocruce de hembras híbridos (F1) (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) con machos de las especies parentales. *CIVA 2002: Comunicaciones y Foros de Discusión*, 688-693.
- Martins C e Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. Chapter X. In: Williams CR (ed.), *Focus on Genome Research*. Nova Science Publishers, New York, USA.
- Mayden RL, Tang KL, Conway KW, et al. (2007) Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *J. Exp. Zool.*, 308B: 642-654.
- Melo JSC e Pereira JA (1994) Crescimento do híbrido tambacu (fêmea de *Colossoma macropomum* x macho de *Piaractus mesopotamicus*) em criação intensiva. *Bol. Tec. CEPTA*, 7: 59-75.
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF e Foresti F (2009) Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Mol. Ecol. Res.*, 9: 771-773.
- Mendonça FF, Hashimoto DT, De-Franco B, Porto-Foresti F, Gadig OBF, Oliveira C e Foresti F (2010) Genetic identification of lamniform and carcharhiniform sharks using multiplex-PCR. *Conserv. Genet. Res.*, 2: 31-35.
- Meyer A (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka PW e Mommsen TP (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Amsterdam, Elsevier, 1-38.
- Mia MY, Taggart JB, Gilmour AE, Gheyas AA, Das TK, Kohinoor AHM, Rahman MA, Sattar MA, Hussain MG, Mazid MA, Penman DJ e McAndrew BJ (2005) Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using

- DNA microsatellite loci. *Aquaculture*, 247: 267-273.
- Mirande, JM (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotrop. Ichthyol.*, 8(3): 385-568.
- MPA (2010) Produção pesqueira e aquícola – Estatística 2008 e 2009. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília.
- Moritz C, Dowling TE e Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-292.
- Moyer GR, Burr BM e Krajewski C (2004) Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zool. J. Linn. Soc.*, 140: 551-575.
- Na-Nakorn U, Kamonrat W e Ngamsiri T (2004) Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*. *Aquaculture*, 240: 145-163.
- Nirchio M, Fenocchio AS, Swarça AC, Pérez JE, Granado A, Estrada A e Ron E (2003) Cytogenetic characterization of hybrids offspring between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Caryologia*, 56: 405-411.
- Ocalewicz K, Jankun M e Luczynski M (2006) Cytogenetic characteristics of interspecific hybrids and chromosome set manipulated finfish. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F e Kapoor BG (eds.), *Fish Cytogenetics*. Science Publishers, New Hampshire, USA, 502 p.
- Ogden R, Dawnay N e McEwing R (2009) Wildlife DNA forensics - bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endang. Species Res.*, 9: 179-195.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F e Toledo-Filho SA (1988) Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227-236.
- Orsi ML e Agostinho AA (1999) Introdução de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do rio Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, 16(2): 557-560.
- Ortí G, Petry P, Porto GIR, Jégu M e Meyer A (1996) Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA rates genes and the phylogeny of piranhas. *J. Mol. Evol.*, 42(2): 169-182.

- Ortí G, Sivasundar A, Dietz K e Jégu M (2008) Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genet. Mol. Biol.*, 31: 343-351.
- Page TJ e Hughes JM (2010) Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *J. Fish Biol.*, 77: 2093-2122.
- Paiva MP, Andrade-Tubino MF De e Godoy MP (2002) As represas e os peixes nativos do Rio Grande – Bacia do Paraná – Brasil. Interciência, Rio de Janeiro.
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis D, Moritz C e Mable B (eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Palumbi SR (2007) Economic ecology: in the market for minke whales. *Nature*, 447: 267-269.
- Pank M, Stanhope M, Natanson L, Kohler N e Shivji M (2001) Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using Multiplex PCR. *Mar. Biotechnol.*, 3: 231-240.
- Pendás AM, Moran P, Freije JP e Garcia-Vazquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell Genet.*, 67: 31-36.
- Perez J, Martinez JL, Moran P, Beall E e Garcia-Vazquez E (1999) Identification of Atlantic salmon x brown trout hybrids with a nuclear marker useful for evolutionary studies. *J. Fish Biol.*, 54: 460-464.
- Pinheiro MHP, Silva JWM, Nobre MIS e Pinheiro FA (1991) Cultivo do híbrido tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, com a pirapitinga, *Colossoma brachypomum* Cuvier, 1818, na densidade de 5000 peixes/Ha. *Rev. Ciên. Agron.*, 22: 77-87.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Alves AL, Almeida RBC, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F (2008) Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genet. Mol. Biol.*, 31: 195-202.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Senhorini JA e Foresti F (2010) Híbridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. In: Baldisserotto B e Gomes LC (eds.), *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Universidade

- Federal de Santa Maria, 589-606.
- Prado FD (2010) Caracterização citogenética e molecular das espécies pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e seus híbridos utilizados na piscicultura brasileira. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, SP.
- Pullin RSV (1988) Tilapia Genetic Resources for Aquaculture. International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines, 108 pp.
- Reynalte-Tataje DA e Zaniboni Filho E (2010) Cultivo de piapara, piaçu, piava e piau - gênero *Leporinus*. In: Baldisserotto B e Gomes LC (eds.), *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 73-100.
- Rhymer JM e Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 27: 83-109.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X e Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
- Rychlik W, Spencer WJ e Rhoads RE (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.*, 18(21): 6409-6412.
- Saccone C, Giorgi C, Gissi C, Pesole G e Reyes A (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238: 195-209.
- Sanders J, Cribbs J, Fienberg H, Hulburd GC, Katz LS e Palumbi SR (2008) The tip of the tail: molecular identification of seahorses for sale in apothecary shops and curio stores in California. *Conserv. Genet.*, 9: 65-71.
- Sanz N, Araguas RM, Fernández R, Vera M e García-Marín JL (2009) Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conserv. Genet.*, 10: 225-236.
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers – just a matter or fashion?. *Nature Reviews*, 5: 63-69.
- Schwartz FJ (1981) World literature to fish hybrids, with an analysis by family, species, and hybrid: Suppl. 1. NOAA Tech. Rep. NMFS SSRF-750. U.S. Dept. Comm., 507 p.
- Scribner KT, Page KS e Bartron ML (2001) Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev.*

*Fish Biol. Fish.*, 10: 293-323.

- Silva JWM, Caminha MIO, Nobre MIS e Barros-Filho FM (1986) Resultados de um ensaio sobre o cultivo do híbrido do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, com a pirapitinga, *C. brachypomum* Cuvier, 1818, realizado no centro de pesquisas ictiológicas “Rodolpho von Ihering” (Pentecoste, Ceará, Brasil). *Ciê. Agron.*, 17(2): 7-18.
- Sullivan JP, Lundberg JG e Hardman M (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 41: 636-662.
- Suplicy FM (2007) Freshwater fish seed resources in Brazil. In: Bondad-Reantaso MG (ed.), *Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 501. FAO, Rome, 129-143.
- Tamura K, Dudley J, Nei M e Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599.
- Tave D (1993) Genetics for Fish Hatchery Managers. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 19: 265-293.
- Thompson JD, Higgins DG e Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Bernardino G e Calcagnotto D (1994) Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. Cadernos de Ictiogenética 2, CCS/USP, São Paulo.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Calcagnotto D, Santos SBAF e Bernardino G (1998) Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura. Cadernos de Ictiogenética 4, CCS/USP, São Paulo.
- Torrico JP, Hubert N, Desmarais E, et al. (2009) Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 51: 588-594.
- Vincze T, Posfai J e Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.*, 31: 3688-3691.

- Vitule JRS, Freire CA e Simberloff D (2009) Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish Fish.*, 10: 98-108.
- Yang F, O'Brien PC, Milne BS, Graphodatsky AS, Solanky N, Trifonov V, Rens W, Sargan D e Ferguson-Smith MA (1999) A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics*, 62(2): 189-202.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR e Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. Royal Soc.*, 360: 1847-1857.
- Ward RD (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol. Ecol. Res.*, 9: 1077-1085.
- Welcomme RL (1988) International introductions of inland aquatic species. FAO Fish. Tec. Papers, Roma, n. 294.
- White TJ, Bruns T, Lee S e Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ e White TJ (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, 315-322.
- Wolf C, Burgener M, Hubner P e Luthy J (2000) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Labensm. Wiss. Technol.*, 33: 144-150.
- Young WP, Ostberg CO, Keim P e Thorgaard GH (2001) Genetic characterization of hybridization and introgression between anadromous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss irideus*) and coastal cutthroat trout (*O. clarki clarki*). *Mol. Ecol.*, 10: 921– 930.
- Zhang Q e Tiersch TR (1997) Chromosomal inheritance patterns of intergeneric ictalurid fishes: Odd diploid numbers with equal parental distributions. *J. Fish Biol.*, 51: 1073-1084.