



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE
HÍBRIDOS E INTROGRESSÃO GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE *Pseudoplatystoma corruscans* E
*Pseudoplatystoma reticulatum***

Fernanda Dotti do Prado

BOTUCATU-SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE
HÍBRIDOS E INTROGRESSÃO GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE *Pseudoplatystoma corruscans* E
*Pseudoplatystoma reticulatum***

FERNANDA DOTTI DO PRADO

ORIENTADOR: FÁBIO PORTO FORESTI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU-SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Prado, Fernanda Dotti do.

Marcadores moleculares na identificação de híbridos e introgressão genética em populações de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* / Fernanda Dotti do Prado. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Porto Foresti

Capes: 20204000

1. Peixe - Identificação. 2. Aquicultura. 3. Híbridação. 4. Diversidade genética. 5. Genética de popula es.

Palavras-chave: Diversidade e estrutura o genética; H brida o; Introgressão genética; Microsatélites; *Pseudoplatystoma*.



Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru



“... e se o olhar tenta seguir o voo de uma vistosa borboleta, ele é interrompido por alguma árvore ou fruta estranha. E ao olhar um inseto, ele é deixado de fora para que uma maior atenção seja dada à estranha flor sobre a qual ele rasteja.... A mente é um caos de encanto.”

Charles Darwin

A minha família, em especial a minha mãe Luzia

Agradecimentos

Meu agradecimento a todas as Instituições e pessoas que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, em particular:

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro concedido (Processo Fapesp 2009/18326-4).

Ao programa de Pós Graduação (A/C: Genética) da UNESP, Campus de Botucatu, que possibilitou o desenvolvimento deste Doutorado.

À seção de Pós Graduação do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti. Por me receber em seu laboratório desde o início da minha graduação, por todos os ensinamentos, orientação e oportunidades que me ofereceu até hoje, fundamentais para o meu crescimento profissional e humano. Agradeço também pela amizade e bons momentos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelos valiosos ensinamentos e oportunidades. Por disponibilizar o laboratório e amostras para as análises deste projeto.

Ao professor Dr. Jehud Bortolozzi, pelas oportunidades de ministrar disciplinas e monitorias. Pelos ensinamentos em genética e evolução, e pela amizade durante a graduação e pós-graduação.

Ao pesquisador Dr. José A. Senhorini, pelas coletas e amostras de material biológico. Por sempre apoiar e incentivar a pesquisa com os bagres, por sua amizade e parceria.

Ao pesquisador Dr. Diogo Teruo Hashimoto, pela amizade e pela ajuda e ensinamentos no desenvolvimento dos marcadores genéticos e estudo da hibridação.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira pelas amostras de material biológico e por disponibilizar as análises no laboratório.

Ao Prof. Dr. Luiz H. Garcia Pereira, Prof. Dr. Celso Benites e Dr. Sebastián Sanchez, por disponibilizarem amostras de material biológico para este trabalho.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Genética de Peixes de Bauru: Aline, Andrea, Bruna, Caio, Diego, Faiçall, Flávio, Maíce, Manolo, Milena, Raquel, Rosangela, Sandro, Vinícius, Will, assim como Carol, Daniela, Diogo, Tatiana e todos os demais alunos que já estiveram no laboratório. Agradeço pela ajuda com as práticas moleculares, programas, análise dos dados, formatação da tese e inglês. Além disso, sou especialmente grata pela amizade e por nos ajudarmos uns aos outros, aprendendo a conviver com as diferenças e nos tornando pessoas melhores.

Aos professores, técnicos e amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP, Campus de Botucatu. Obrigada pela estrutura disponibilizada, pelos ensinamentos e bons momentos em eventos científicos e trabalhos no laboratório;

Ao professor Paulino Martínez Portela, por ter me receber tão bem em seu laboratório em Lugo e pelos importantes ensinamentos em genética. Também agradeço pelos ótimos momentos de confraternização do laboratório e almoços que nos ofereceu em sua casa, além de todo o incentivo e amizade.

A todos os professores, pesquisadores, alunos e técnicos do grupo ACUIGEN, Faculdade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha: Adrián, Belén, Carlos, Carmen, Diego, Jorge, José, Laura, Lucía, María Portela, María (Peque), Manuel, Mónica, Miguel, Paulino, Raquel, Sonia, Susana, Vanessa e Xoana. Obrigada pelo auxílio com as técnicas moleculares, documentação e programas. Em especial, agradeço à Raquel, Jorge e Belen, por me ensinarem as análises genéticas com paciência e dedicação. À Susana, por ser uma pessoa sincera e humana, pelos momentos divertidos e por ajudar em tudo. Além disso, sou grata a todos pela amizade que recebi desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório.

Ao Carlos, María, Pepe, Susana, Júlio, Tori, Néstor, Homero, Xoana e todos os amigos que conheci na Espanha. Vocês fizeram da minha estadia muito especial, me transmitindo um sentimento de que a Galícia é a minha segunda casa. Foram momentos únicos, de aprendizado e crescimento, os quais levarei por toda a vida.

Ao André, Daiana, Dani, Simony, Thiago e todos os meus amigos pessoais. Amigos de Bauru, da VBS, da época da graduação em Biologia, enfim os que fizeram ou ainda fazem parte da minha vida. Vocês são meus irmãos do coração, essenciais em minha vida.

Ao André, que compartilha comigo o amor pela Biologia, obrigada por me ajudar com as dúvidas na pesquisa e com a tese. Principalmente agradeço pela amizade, por todos os momentos que passamos juntos e por ser um amigo sempre alegre e leal.

A toda minha família, por seu amor, compreensão e incentivos. Por terem me ensinado que o mais importante na vida é a integridade e o respeito ao próximo. Por todo o esforço para a minha formação. Às minhas tias Ana e Mali, por seu carinho e por serem grandes amigas. Aos meus avós Maria Thereza, Margarida e Cândido, por terem me criado com tanto amor e dedicação. Ao Geraldo, Nancy, Henrique e toda a família Stabile.

Ao meu companheiro de vida Felipe (Batche), por todo o apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, paciência, conselhos e incentivos, fundamentais para finalizarmos mais esta etapa em nossas vidas. Por sempre estar disposto a ouvir e ajudar, não medindo esforços para me fazer feliz. Por me transmitir calma e tranquilidade e ao mesmo tempo me ensinar muito a cada dia. Você é uma pessoa incrível, te amo!

À minha mãe, por seu amor incondicional, por sempre ser amiga e companheira. Por tudo o que passamos juntas, superando as dificuldades e acreditando no amor. Não tenho palavras para descrever o quanto te amo... você é o meu exemplo de vida, caráter e bondade. Obrigada por tudo!

RESUMO

Níveis de diversidade e estruturação genética, assim como a investigação de eventos de hibridação interespecífica ou introgressiva em populações selvagens, estão entre as principais análises a serem consideradas em projetos de conservação. A hibridação entre espécies nativas de peixes, principalmente quando decorrente de ações humanas, tem levado a taxas crescentes de cruzamentos não naturais entre diferentes *taxa*, o que pode ocasionar impactos ecológicos e genéticos. As espécies de bagres Neotropicais, *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma corruscans*, têm sido afetadas pela produção induzida de híbridos na aquicultura e pelo contato destes híbridos com suas populações. Neste estudo foram desenvolvidos diferentes marcadores genéticos (genes e microssatélites) com o intuito de identificar a ocorrência de hibridação e introgressão em rios da América do Sul e para acessar a diversidade genética intra e interpopulacional destas espécies. Marcadores dos genes nucleares EF1 e 18S foram completamente diagnósticos na identificação das espécies e seus híbridos. Através de um pirosequenciamento Roche 454, foram desenvolvidos e caracterizados 16 microssatélites para *P. reticulatum*, os quais apresentaram 100% de transferabilidade em *P. corruscans* e alto polimorfismo para a maioria dos *loci* estudados. As análises populacionais utilizando estes microssatélites revelaram alta variabilidade para ambas espécies em todos os rios das bacias hidrográficas do Paraguai e Paraná. A diferenciação genética interpopulacional destas espécies dentro da bacia do Paraguai foi baixa ou inexistente, revelando um alto fluxo gênico e a possível existência de uma população panmítica resultante da migração e reprodução entre indivíduos de rios próximos. Porém, diferenças genéticas significativas foram observadas entre rios distantes geograficamente e entre bacias hidrográficas distintas. Em *P. reticulatum*, foi verificada diferenciação genética entre os rios Cuiabá e Miranda (bacia do Paraguai), e entre os rios da bacia do Paraguai e Baixo Paraná, porém, sem evidências de estruturação genética ($K=1$). Em *P. corruscans*, uma diferenciação significativa foi encontrada entre os rios das bacias do Paraguai+Baixo Paraná (similares geneticamente) e os rios do Alto Paraná. Foram observados 2 grupos distintos estruturados ($K=2$), o que pode ser devido à distância geográfica e ao isolamento entre estes locais pela usina de Itaipú. Estes diversos cenários de diferenciação populacional entre as espécies podem estar relacionados a distintos comportamentos migratórios. A avaliação inicial da hibridação nas populações naturais destas espécies utilizando três genes nucleares e um marcador mitocondrial demonstrou a ocorrência das espécies parentais em 12 rios

distribuídos pelas bacias do Tocantins/Araguaia, Paraguai, Paraná e Uruguai (América do Sul), inclusive em populações simpátricas, o que indica que a hibridação natural entre estes peixes seja rara. Porém foi registrada a presença de F1 e retrocruzamentos com *P. reticulatum* (50% de híbridos) no rio Aquidauana (bacia do Paraguai), híbridos F1 no rio Paraná (3.92%), híbridos F1 e retrocruzamentos com *P. reticulatum* (44.19 %) no rio Mogi-Guaçu (bacia do Alto Paraná). Neste rio também foi identificada a possível introdução da espécie *P. reticulatum*, que não ocorria neste ambiente. Como estas populações estão localizadas em regiões onde existe um alto número de pisciculturas, possivelmente estejam ocorrendo escapes e introduções acidentais de híbridos na natureza. As análises interespecíficas de oito microssatélites revelaram alta diferenciação genética entre as espécies parentais, o que foi confirmado por dois grupos claramente distintos após a análise bayesiana ($K=2$). Estes marcadores identificaram precisamente a hibridação e disponibilizaram importantes indícios de híbridos e intogressão genética nas populações, como desequilíbrios de ligamento e excesso de heterozigotos. Além disso, os testes utilizando diferentes marcadores nucleares demonstraram que a combinação dos marcadores diagnósticos (quatro *loci* microssatélites e três genes) através de análises bayesianas pode ser a metodologia mais precisa para distinguir as espécies e híbridos em nível individual. Estes resultados disponibilizam dados importantes no que se refere ao desenvolvimento e aplicação de um grupo de marcadores genéticos no estudo da diversidade genética e hibridação em populações selvagens, os quais podem ser utilizados em estudos evolutivos, ecológicos e genéticos de *P. corruscans* e *P. reticulatum*, e também como parâmetros no estabelecimento de áreas a serem conservadas e em políticas de manejo.

ABSTRACT

Levels of genetic diversity and structure, as well as the investigation of interspecific and introgressive hybridization events in wild populations, are amongst the major analyzes to be considered in conservation projects. Hybridization between native fish species, especially when caused by human actions, has led to increasing rates of non natural crosses between different taxa, which may cause ecological and genetic impacts. The Neotropical catfish species, *Pseudoplatystoma reticulatum* and *Pseudoplatystoma corruscans*, have been affected by the induced production of hybrids in aquaculture and by the contact of these hybrids with their populations. In this study, different genetic markers were developed (genes and microsatellites), in order to identify the occurrence of hybridization and introgression in South American rivers and to access the intra and inter populational genetic diversity of these species. EF1 and 18S nuclear gene markers were completely diagnostics in the identification of the species and their hybrids. Through a Roche 454 pyrosequencing, were developed and characterized 16 microsatellite loci for *P. reticulatum*, which presented 100% of transferability in *P. corruscans* and high polymorphism for the majority of the loci. Population analysis using these microsatellites revealed high variability for the both species in all rivers from Paraguay and Paraná hydrographic basins. The interpopulational genetic differentiation of these species within the Paraguay basin was low or absent, revealing a high gene flow and the possible existence of a panmitic population, resulting from the migration and reproduction of individuals from closely rivers. However, significant genetic differences were observed between geographically distant rivers and distinct hydrographic basins. In *P. reticulatum*, genetic differentiation was found between the Cuiabá and Miranda Rivers (Paraguai basin), and between Paraguay and Lower Paraná basins, but without evidences of genetic strutting ($K=1$). In *P. corruscans*, a significant genetic differentiation was found between the rivers of the Paraguay+Lower Paraná (genetically similar) and Upper Paraná basins. Two structured groups ($K = 2$) were observed, which may be due to the geographical distance and the isolation between these sites by the Itaipu dam. These several scenarios of population differentiation between the species may be related to distinct migratory behaviors. The initial assessment of hybridization in natural populations of these species, using three nuclear genes and one mitochondrial marker demonstrated the occurrence of the parental species in 12 rivers distributed in the Tocantins/Araguaia, Paraguay, Parana and Uruguay basins (South America), even in sympatric populations, indicating that the natural

hybridization between these fishes is rare. However, were registered the presence of F1 hybrids and backcrosses with *P. reticulatum* (50% of hybrids) in the Aquidauna River (Paraguai basin), F1 hybrids in the Paraná River (3.92%), F1 and backcrosses with *P. reticulatum* in the Mogi-Guaçu River (44.19%) (Upper Parana basin). In this river was also identified the possible introduction of *P. reticulatum*, which did not occur naturally in this environment. As these populations are located in regions where there is a high number of fish farms, are likely occurring escapes and accidental introductions of hybrids in nature. The interspecific analyzes of eight microsatellites revealed high genetic differences between the parental species, which was confirmed by two clearly distinct groups after the bayesian analysis ($K = 2$). These markers have precisely identified the hybridization and provided important evidences of hybrids and genetic introgression in the populations, as linkage disequilibrium or heterozygote excess. In addition, tests using different nuclear markers demonstrated that the combination of the diagnostic markers (four microsatellites and three genes) through bayesian analysis may be the most accurate methodology in distinguishing species and hybrids in an individual level. These results provide significant data regarding to the development and application of a group of genetic markers in the study of genetic diversity and hybridization in wild populations, which can be used in evolutionary, genetic and ecological studies of *P. corruscans* and *P. reticulatum*, and also as parameters in the establishment of areas to be conserved and management policies.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Diversidade e estrutura genética na conservação biológica	1
1.2 Aspectos evolutivos e ambientais da hibridação interespecífica	2
1.3 Considerações sobre as espécies Neotropicais <i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i>	5
1.3.1 Conservação das espécies <i>P.corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i>	7
1.4 Marcadores genético moleculares e suas aplicações na conservação.....	8
1.4.1 Hibridação e introgressão genética.....	9
1.5 Justificativa.....	12
1.6 Objetivos.....	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Amostragem de material biológico.....	14
2.2 Extração de DNA.....	18
2.3 Desenvolvimento e aplicação dos marcadores moleculares.....	19
2.3.1 Genes nucleares e mitocondrial.....	20
2.3.2 Microssatélites	24
2.3.3 Avaliação de híbridos e introgressão utilizando genes nucleares e mitocondrial ...	26
2.3.4 Aplicação dos microssatélites no estudo das populações naturais	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
Capítulo 1	32
Capítulo 2	50
Capítulo 3	70
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
6. APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade e estrutura genética na conservação biológica

A variabilidade ou diversidade genética, ou seja, os diferentes alelos e genótipos presentes em populações ou espécies são a base da biologia evolutiva no planeta (Frankham e Briscoe, 2002). A presença de variação genética é essencial para o potencial de sobrevivência das espécies e para a evolução com sucesso em resposta a mudanças ambientais (Laikre et al., 1999). A seleção natural favorece alelos que são superiores em um determinado ambiente, assim, caso não haja variação genética, indivíduos melhor adaptados nunca poderão ser criados (Laikre et al., 1999).

A diversidade gênica é geralmente referida como variabilidade intraespecífica e representa a diversidade biológica dentro de uma única espécie. Esta variação pode ser intrapopulacional, distribuída dentro de uma população e expressa como diferentes combinações alélicas entre os indivíduos (genótipos) e interpopulacional, distribuída entre as populações, na forma de diferenças na ocorrência e frequência dos alelos (Laikre et al., 1999).

Uma população é definida como um conjunto de indivíduos intercruzantes da mesma espécie, que vive em proximidade de forma a manter o sistema de acasalamento em comum (Templeton, 2011). Associada com cada população local está uma população correspondente de genes locais chamada de *pool* gênico, o conjunto de genes coletivamente compartilhados pelos indivíduos de uma população (Templeton, 2011).

Populações selvagens têm sofrido impactos negativos constantemente, decorrentes principalmente da sobre-exploração de recursos naturais, poluição e introdução de espécies (Frankham e Briscoe, 2002). Estes eventos podem causar fragmentação e redução de habitats e uma conseqüente diminuição do tamanho de populações selvagens, inibindo o fluxo de genes adaptáveis entre populações e interrompendo o processo adaptativo (Templeton, 2011). Quando o fluxo gênico é severamente restrito, fragmentos de populações de baixa abundância tornam-se cada vez mais vulneráveis a características correlacionadas com o risco de extinção, incluindo a perda de variação genética através de deriva genética, o acúmulo de mutações ligeiramente deletérias, depressão por endogamia, e a incapacidade de se adaptar às mudanças (Laikre et al., 1999; Frankham e Briscoe, 2002).

Esta intensificação das mudanças ambientais tem aumentado a necessidade de variabilidade genética nas populações naturais para que possam responder a estas mudanças.

Ao mesmo tempo, as manipulações humanas têm reduzido a variabilidade genética, sendo que a perda de alelos e combinações alélicas pode ocorrer extremamente rápido, dentro de apenas uma geração (Laikre et al., 1999). Recursos genéticos podem ser perdidos como resultado direto da extinção das espécies, o que é irreversível, ou por redução da variabilidade genética dentro de uma espécie (Oliveira et al., 2009).

Conservar espécies, portanto, não é o suficiente; o seu potencial evolutivo, representado pela variabilidade genética intra e interpopulacional também precisa ser conservado (Frankham e Briscoe, 2002; Frankham et al., 2008). Uma etapa importante em análises populacionais é a verificação de estruturação genética e a ocorrência ou não de fluxo gênico. Esta informação possibilita esclarecer que forma a variabilidade genética está distribuída ao longo da distribuição geográfica da espécie, verificar o que é necessário conservar e como deve ser feito o manejo e monitoramento da diversidade biológica das populações que estejam ameaçadas (Laikre et al., 1999). Como exemplo, as diretrizes para conservação genética de trutas indicam que o acesso à estruturação genética populacional, a fim de ter conhecimento sobre a quantidade e distribuição dos recursos genéticos, é essencial para qualquer tipo de manejo (Laikre et al., 1999).

Outro tema importante na conservação de populações naturais é a hibridação interespecífica que, quando intensivamente provocada por ações humanas, pode estar relacionada com a perda de diversidade genética. Quando os genomas de espécies distintas se misturam através da hibridação, pode ocorrer a perda de alelos (extinção genética), ou o rearranjo de combinações gênicas previamente existentes e que provavelmente podem nunca mais ser recriadas, resultando no desaparecimento de adaptações a determinados ambientes (Laikre et al., 1999). A hibridação e introgressão de genes entre espécies estão entre as principais ameaças para a conservação de muitas espécies de plantas e animais, e suas taxas de ocorrência têm aumentado dramaticamente em todo o mundo, ocasionadas por introduções intencionais e acidentais de organismos e modificações de habitats (Allendorf et al., 2001; 2010).

1.2 Aspectos evolutivos e ambientais da hibridação interespecífica

O cruzamento espontâneo entre diferentes espécies sempre foi considerado pela maioria dos zoólogos como um evento esporádico em animais que se mantêm em frequências baixas (Mayr, 1963). Isso se deve a muitos exemplos onde os híbridos F1 (interespecíficos ou geração

filial 1) são estéreis e apresentam menor viabilidade em um ambiente onde as espécies puras estão melhor adaptadas (Mayr, 1963). Além disso, na maioria dos casos existem barreiras pré e pós zigóticas bem definidas que mantêm um isolamento reprodutivo espacial, temporal e comportamental entre espécies diferentes (Mayr, 1963).

Geralmente híbridos interespecíficos são intermediários entre suas espécies parentais nos caracteres em que elas diferem tais como forma do corpo, coloração externa, estrutura e número de partes corporais (vértebras, rastros branquiais, raios da nadadeira, dentes) (Hubbs, 1955). Porém, os níveis de viabilidade e desempenho dos híbridos podem variar e serem menores, equivalentes ou até maiores (vigor híbrido resultante da alta heterose destes animais) em relação a suas espécies parentais (Arnold e Hodges, 1995). Se os híbridos interespecíficos são estéreis, uma hibridação ocasional pode ter baixo impacto para as espécies puras e os híbridos F1, caso sejam menos adaptados, provavelmente serão removidos através de processos de seleção natural (Arnold e Hodges, 1995; Toledo-Filho et al., 1998). Mesmo em casos onde os híbridos F1 sejam férteis, as linhagens híbridas avançadas (indivíduos resultantes de cruzamentos de linhagens híbridas entre si ou retrocruzamentos de híbridos com espécies parentais puras) usualmente são menos adaptadas do que as espécies parentais, partindo do pressuposto de que seus diversos tipos de genótipos recombinantes perdem a heterose e nunca foram testados pela seleção natural (Barton, 2001).

Atualmente também tem sido reconhecido que a hibridação, mesmo em pequena escala, pode contribuir em processos adaptativos e de especiação (Arnold et al., 1999; Barton, 2001; Mallet, 2007; Willis et al., 2012; Abbott et al., 2013). Estima-se, em geral, que aproximadamente 6 a 10% das espécies animais realizem cruzamentos interespecíficos (Mallet, 2005). Em alguns casos, a hibridação introgressiva, ou seja, a transferência do DNA de uma espécie para o conjunto genômico de outra espécie, por retrocruzamento repetido dos indivíduos híbridos com uma ou ambas as espécies parentais, pode ser uma importante fonte de variabilidade genética nas populações (Arnold e Martin, 2009). A introgressão de poucos *loci* pode promover a divergência adaptativa e assim facilitar a especiação (Abbott et al., 2013). Sugere-se, por exemplo, que a hibridação pode ser um mecanismo de especiação em ciclídeos, contribuindo para a alta diversidade de espécies (Smith et al., 2003).

A hibridação natural pode não constituir ameaças ecológicas às espécies envolvidas, justamente por estar intimamente relacionada aos processos evolutivos das espécies durante a sua história biológica e geralmente ser caracterizada pela ocorrência de eventos esporádicos de cruzamentos interespecíficos entre espécies simpátricas, resultando na formação de zonas

híbridas que podem manter-se estáveis por milhares de anos em uma determinada região geográfica (Arnold et al., 1999; Barton, 2001; Mallet, 2005; Willis et al., 2012). A hibridação introgressiva pode ser observada em habitats naturais não perturbados (Willis et al., 2012), sugerindo que algum grau de fluxo gênico é um processo normal, faz parte da construção dos processos evolutivos, sendo que alguns genes e genótipos usualmente são modificados através do tempo (Rhymer e Simberloff, 1996).

No grupo dos peixes, principalmente nas espécies continentais, a formação de híbridos é mais comum quando comparada com outros animais, devido à fertilização externa, competição por territórios de desova e convivência em ambientes limitados que facilitam o cruzamento interespecies (Hubbs, 1955). Características genéticas próprias dos híbridos de peixes também podem favorecer o aparecimento de linhagens híbridas avançadas, pois os híbridos F1 férteis, apesar de possuírem gametas com complementos cromossômicos desequilibrados, podem manter parcialmente suas capacidades genéticas e funcionais, gerando descendentes viáveis (Toledo-Filho et al., 1994).

No entanto, para muitas espécies não existem dados sobre quando a hibridação ocorre, tanto em termos de número de espécies que inter cruzam como a proporção de indivíduos com ascendência híbrida (Willis et al., 2012). A contribuição destes eventos para a adaptação ou especiação vai depender basicamente de como e onde as populações inter cruzantes ocorrem, dos níveis de fertilidade dos híbridos F1 e da possibilidade de vantagem adaptativa e estabelecimento das linhagens híbridas (Barton, 2001). Verificar se existem híbridos em populações naturais, sua frequência e a ocorrência de introgressão genética são dados importantes em projetos que envolvam a preservação ou conservação de populações nativas (Allendorf et al., 2001; 2010). Além disso, é importante assumir qual o cenário que originou a hibridação, ou seja, se é consequência direta de modificações ambientais propiciadas por ações humanas ou está relacionada estritamente a fatores ambientais naturais (Allendorf et al., 2001).

Nas últimas décadas tem sido verificado um aumento brusco na ocorrência de híbridos e introgressão genética no ambiente selvagem, onde o principal fator de mudança ambiental é o homem, responsável direta ou indiretamente por cerca de metade dos eventos de hibridação (Rhymer e Simberloff, 1996; Scribner et al., 2001; Allendorf et al., 2010; Lamer et al., 2010). Entre os processos de ação antropogênica relacionados à hibridação em peixes está a destruição de locais de desova, alterações ambientais que podem modificar o comportamento reprodutivo, introdução de espécies exóticas e o escape ou introduções de híbridos artificiais

produzidos na aquicultura (Bartley et al., 2001; Scribner et al., 2001; Porto-Foresti et al., 2010; Prado et al., 2012a).

A hibridação interespecífica resultante de ações antrópicas, como podem ocorrer em um curto espaço de tempo, podem levar a modificações ecológicas e genéticas irreversíveis (Allendorf et al., 2010). Em ambientes onde apenas os híbridos F1 são encontrados, ou seja, são estéreis, as consequências da hibridação podem envolver competição e a perda de esforços reprodutivos das espécies parentais, sem modificação genética (Toledo-Filho et al., 1994; 1998). Por outro lado, quando os híbridos são férteis e ocorre introgressão, pode ocorrer a formação de uma população composta inteiramente por híbridos ("mistura" genética ou "*hybrid swarms*"), a diluição dos genomas parentais e decorrente extinção genética das espécies parentais, onde a população será formada essencialmente por indivíduos recombinantes (Huxel, 1999; Epifanio e Philipp, 2001; Muhlfeld et al., 2009; Allendorf et al., 2001; Allendorf et al., 2010). Mesmo que seja formada uma população de híbridos, a questão é se estes indivíduos irão se adaptar e permanecer no ambiente ou todo o *pool* gênico das populações e espécies hibridizadas será perdido (Allendorf et al., 2001; 2010).

1.3 Considerações sobre as espécies Neotropicais *P. corruscans* e *P. reticulatum*

Os peixes das espécies *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim “pintado”) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (surubim “cachara”) são bagres pertencentes à família Pimelodidae, na qual está incluída grande parte dos Siluriformes da região Neotropical, com mais de noventa espécies descritas (Lundberg e Littmann, 2003; Ferraris et al., 2007). Representam um importante papel ecológico (regulação de topo de cadeia) por serem grandes predadores e desta forma, exercerem forte pressão sobre os níveis inferiores da cadeia trófica aquática (Resende et al., 1996).

Sua distribuição é endêmica do continente Sul Americano, com ampla ocorrência em rios de importantes bacias hidrográficas. Ocorrem em simpatria na bacia do Prata, que inclui as bacias dos rios Paraguai, Paraná e Uruguai (abrangendo os países Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) (Lundberg e Littman, 2003; Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Em outras localidades ocorre apenas uma das espécies, como *P. corruscans* na bacia do rio São Francisco e *P. reticulatum* na bacia Amazônica (Lundberg e Littman, 2003; Buitrago-Suárez e Burr, 2007).

Anteriormente, o surubim “cachara” era a espécie mais amplamente distribuída dentro do gênero *Pseudoplatystoma*, classificada como *P. fasciatum* e com distribuição nas bacias do Amazonas, Magdalena, Orinoco, Paraná-Paraguai e Tocantins-Araguaia (Lundberg e Littmann, 2003). Uma nova classificação desta espécie, feita por Buitrago-Suárez e Burr (2007) dividiu a espécie em *P. fasciatum* (restrita a região das Guianas), *P. punctifer* (bacias Amazônica e Tocantins-Araguaia), *P. orinocoense* (bacia do Orinoco), *P. magdaleniatum* (rio Magdalena) e *P. reticulatum* (bacia Paraná-Paraguai e Bacia Amazônica). Porém, ainda existem controvérsias a respeito da classificação de *P. reticulatum*. Torrico et al. (2009), utilizando dados moleculares de DNA mitocondrial, confirmaram que *P. tigrinum*, *P. reticulatum*, *P. corruscans* e *P. magdaleniatum* estão realmente diferenciados em espécies distintas. Outro estudo genético indicou que as espécies *P. punctifer*, *P. reticulatum* e *P. fasciatum* estão agrupadas em um único clado, que também pode ser referido como *P. fasciatum (latu sensu)* (Carvalho-Costa et al., 2011), sendo necessárias futuras revisões taxonômicas neste grupo (Torrico et al., 2009; Carvalho-Costa et al., 2011).

Dentre os diversos parâmetros morfológicos e taxonômicos utilizados para distinguir os surubins pintado e cachara, as manchas da pele são as características externas mais marcantes, onde *P. corruscans* apresenta uma pigmentação composta por manchas escuras e circulares (pontos) e *P. reticulatum* um padrão de bandas reticuladas escuras (listras) (Buitrago-Suarez e Burr, 2007). Ambos os peixes apresentam grande porte, porém, com tamanhos distintos, que podem atingir valores aproximados de 140 cm e 40 Kg para *P. corruscans* e de 114 cm e 15 Kg para *P. reticulatum* (Resende et al., 1996; Mateus e Penha, 2007).

Estas espécies alcançam a maturidade sexual por volta dos quatro anos e meio de idade, tem alta fecundidade, não apresentam cuidado parental com a prole e possuem um tempo de vida aproximado de 15 anos (Resende et al., 1996; Mateus e Penha, 2007). São peixes migratórios que realizam movimentos laterais complexos entre rios, lagos e várzeas de rios, assim como movimentos longitudinais ao longo dos canais fluviais (Carolsfeld et al., 2003; Godinho et al., 2007). As migrações para reprodução são anuais, com início no período chuvoso onde nadam para as cabeceiras dos rios para se reproduzir, usualmente durante os meses de outubro a janeiro (Resende, 2003; Godinho et al., 2007). Assim como outros bagres, realizam dois fluxos migratórios principais durante o ano: inicialmente permanecem nos leitos dos rios durante fevereiro a setembro (época de alimentação), em outubro iniciam a migração rio acima (época de reprodução) e posteriormente os adultos migram rio abaixo para se

alimentar no rio principal, enquanto os juvenis permanecem por algum tempo nos lagos (Resende, 2003; Godinho et al., 2007).

Estudos com *P. corruscans* no rio São Francisco demonstraram que o estilo de migração foi dualístico, com indivíduos residentes (não migratórios) e peixes migratórios (Godinho et al., 2007). De acordo com os autores, esta espécie pode realizar desovas múltiplas, onde as fêmeas visitam os locais de reprodução várias vezes durante as enchentes. Também foi evidenciado que possivelmente esta espécie apresenta o comportamento de “*homing*”, ou seja, retorne sempre ao seu local de nascimento para se reproduzir (Pereira et al., 2009). Contudo, ainda há pouco conhecimento sobre o comportamento migratório destas espécies, como as distâncias que percorrem e os movimentos da história de vida e de desova de adultos, especialmente para *P. reticulatum*.

Além de sua importância biológica nos ambientes onde ocorrem, estes bagres estão entre as principais espécies nativas mais produzidas no Brasil (Crepaldi et al., 2006; Campos, 2010; Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010). Sua carne é apreciada pelo consumidor pela ausência de espinhos intramusculares e são consideradas espécies nobres na pesca, além de seu papel recreativo em estabelecimentos de lazer como “*pesque-pagues*” e “*pesque-solte*” (Crepaldi et al., 2006; Campos, 2010; Porto-Foresti et al., 2010).

1.3.1 Conservação das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*

A pesca excessiva dos bagres *P. corruscans* e *P. reticulatum*, associada à poluição dos ambientes aquáticos e construções de barragens que dificultam ou impedem sua migração, representa um fator crucial na diminuição de suas populações selvagens (Carolsfeld et al., 2003; Mello et al., 2009). Recentemente, *P. corruscans* foi incluída como criticamente ameaçada (Mello et al., 2009).

Outro fator preocupante para a sua conservação é a atual produção em larga escala de híbridos interespecíficos em pisciculturas brasileiras (Campos, 2010; Porto-Foresti et al., 2010). Os produtores relatam vantagens destes híbridos F1, com uma combinação de características proveitosas de ambas as espécies, como maior crescimento, diminuição do canibalismo e maior facilidade de manejo (Campos, 2010; Crepaldi et al., 2006). Estas vantagens, somadas ao fato de *P. corruscans* ser a espécie mais popular entre os consumidores, têm levado a uma produção generalizada de alevinos híbridos para serem

comercializados, superando a produção das espécies puras (Campos, 2010; Crepaldi et al., 2006; Porto-Foresti et al., 2010).

Embora os adultos híbridos F1 possam ser parcialmente identificados através do seu padrão de manchas na pele (intermediário entre as espécies, com pontos e listras), os alevinos e juvenis são muito parecidos com as espécies puras (Porto-Foresti et al., 2010). Além disso, foi comprovada a fertilidade de um dos híbridos recíprocos em cultivo (híbrido "cachapinta", resultante do cruzamento entre fêmea de *P. reticulatum* e macho de *P. corruscans*), que pode gerar híbridos F2 ou retrocruzar com os parentais (Prado et al., 2012b). As linhagens híbridas avançadas entre estas espécies apresentam características morfológicas muito variáveis, o que dificulta sua identificação morfológica (José A. Senhorini, comunicação pessoal).

Os problemas resultantes desta falta de identificação correta das linhagens em cultivo são mistura, venda equivocada de produtos e prejuízos para a piscicultura e para o meio ambiente. Apenas *P. corruscans* é citada nas estatísticas oficiais de pesca (IBAMA, 2007; Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010), porém, a maioria dos juvenis de *Pseudoplatystoma* produzidos no país são híbridos, comercializados e rotulados apenas como "pintado" (Campos, 2010). Em relação à natureza, foi relatada a ocorrência destes híbridos em populações selvagens, o que provavelmente resulta de escapes ou introduções dos estoques de cultivo (Veríssimo et al., 2005; Bignotto et al., 2009; Prado et al., 2012a), e coloca em risco a integridade genética de populações localmente adaptadas das espécies parentais.

1.4 Marcadores genético moleculares e suas aplicações na conservação

A genética é uma importante ferramenta para o estudo da biodiversidade e para o manejo e conservação de populações selvagens que sofrem impactos antrópicos (Hansen et al., 2001; Schwartz et al., 2007; Allendorf et al., 2010; Zhang et al., 2013). O desenvolvimento de técnicas que permitam visualizar os marcadores do DNA, ou seja, regiões com diferenças nucleotídicas entre espécies e populações (Ferreira e Grattapaglia, 1998), possibilita realizar uma avaliação dos níveis de diversidade genética, estruturação populacional, identificar espécies e hibridação, entre outras análises genéticas.

O número de marcadores de DNA é vasto, uma vez que abrange polimorfismos de regiões de todo o genoma nuclear e mitocondrial do organismo a ser estudado (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Vários tipos diferentes de marcadores genéticos moleculares estão disponíveis para análises de estoques cultivados e selvagens, cada um com suas vantagens e

desvantagens e diferentes características genéticas (dominantes ou codominantes, regiões do DNA nuclear ou mitocondrial, herança maternal ou biparental etc.), e diferentes tipos de procedimentos e técnicas de análise são necessários em cada caso, de acordo com os objetivos de cada etapa do trabalho, custos, requisitos técnicos e de especialização (Blohm et al., 2007; Teletchea, 2009).

1.4.1 Híbridação e introgressão genética

A primeira etapa em estudos que envolvam a identificação de hibridação na natureza é o estabelecimento de ferramentas que possibilitem a distinção dos indivíduos como espécies puras, híbridos F1 ou avançados (Toledo-Filho et al., 1994; Allendorf et al., 2001). Informações taxonômicas fornecem dados importantes para estudos de hibridação, porém, pode ser difícil e duvidoso distinguir híbridos unicamente através parâmetros morfológicos (Demandt e Bergek, 2009). Há algumas décadas a detecção de híbridos assumia a presença de características intermediárias nestes animais (Hubbs, 1955), contudo, alguns híbridos F1 recíprocos podem apresentar diferenças de desempenho e morfologia entre si de acordo com suas espécies parentais maternas e paternas, híbridos F2 podem apresentar fenótipos heterogêneos e híbridos resultantes de retrocruzamentos podem conter uma grande quantidade de genes de uma espécie parental e serem morfológicamente indistinguíveis desta (Leary, 1996; Toledo-Filho et al., 1994; 1998; Allendorf et al., 2001).

Diversos tipos de ferramentas genéticas têm sido desenvolvidas e aplicadas na identificação de híbridos em diversos grupos animais, fornecendo inúmeros marcadores para o estudo da hibridação e introgressão genética (Machado-Schiaffino et al., 2010; Dubut et al., 2010; Bohling et al., 2013; Khosravi et al., 2013). Uma vantagem proporcionada por marcadores do genoma é a possibilidade de uma identificação precisa de espécies parentais e seus híbridos, independente de sua morfologia externa.

A identificação genética de táxons distintos pode ser feita basicamente de duas maneiras: utilizando marcadores moleculares diagnósticos e monomórficos entre as espécies (com pouca variação, como por exemplo genes nucleares conservados com poucas mutações entre as espécies e SNPs - *single nucleotide polymorphism*) ou utilizando marcadores multialélicos polimórficos (microsatélites ou SSR - *simple sequence repeat*), para os quais é necessária uma análise probabilística com base na distribuição das frequências e tamanhos alélicos (Schwartz et al., 2007).

Regiões relativamente conservadas do genoma nuclear, como genes que acumulem diferenças estabelecidas em nível de espécie e não apresentem variação intraespecífica, são úteis na identificação dos diferentes *taxa* e seus híbridos F1, que herdarão os marcadores biparentais e serão geneticamente heterozigotos (Rubidge et al., 2001; Hashimoto et al., 2011a; Porto-Foresti et al., 2013). O DNA mitocondrial, como apresenta herança exclusivamente materna em peixes, altas taxas de evolução e facilidade de isolamento e caracterização (Awise, 1986; Moritz et al., 1987), permite o estabelecimento do parental materno envolvido, e consiste em um marcador eficaz na identificação de espécies, híbridos recíprocos e na direção de eventos de hibridação em ambientes selvagens (Gunnel et al., 2008; Metcalf et al., 2008; Broughton et al., 2011).

Além disso, o desenvolvimento de técnicas que permitam a visualização dos polimorfismos espécie-específicos de diferentes regiões do genoma, como o PCR-multiplex (*Polimerase chain reaction*) e o PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) permitem resultados rápidos e de relativo baixo custo (Teletchea, 2009; Porto-Foresti et al., 2013).

Em relação aos híbridos avançados, após a primeira geração (F1), é difícil decidir quando um indivíduo é um híbrido ou um membro de uma das duas populações parentais submetidos à introgressão (Rhymer e Simberloff 1996). Isso se deve ao alto número de combinações genéticas resultantes do intercruzamento de híbridos F1 entre si ou o retrocruzamento destes híbridos com as espécies parentais (Toledo-Filho et al., 1994, 1998; Scribner et al., 2001).

Em casos simples de identificação de hibridação, um único marcador nuclear com dois alelos fixos pode ser suficiente para classificar indivíduos de uma espécie e seus híbridos F1 (Vähä e Primmer, 2006). Porém, um marcador é eficaz apenas quando a hibridação começou apenas recentemente e a taxa de introgressão é baixa. Quando se usa apenas um alelo diagnóstico, um híbrido avançado poderá apresentar-se homozigoto como seus parentais ou heterozigoto como um híbrido F1 (Toledo-Filho et al., 1994; Allendorf et al., 2001). Assim, a utilização de um conjunto de marcadores nucleares é recomendada para que seja possível identificar a hibridação introgressiva (Vähä e Primmer, 2006; Sanz et al., 2009; Allendorf et al., 2010).

Os microssatélites são regiões abundantes no genoma nuclear que se caracterizam por terem motivos de sequência curta (2 a 6 pares de bases) que se repetem em *tandem* diversas vezes e constituem marcadores altamente polimórficos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Estas

regiões do DNA seguem modelos evolutivos simples (marcadores neutros), e por serem facilmente genotipadas através de PCR, têm sido amplamente desenvolvidas para diferentes espécies e utilizadas para acessar a diversidade genética e detectar estruturação populacional (Oliveira et al., 2009; Ciofi et al., 2011; Vera et al., 2011; Vargas-Ramirez et al., 2012; Storfer et al., 2013).

Apesar de altamente polimórficos estes marcadores podem fornecer marcadores adicionais para identificar espécies e hibridação através de diferentes abordagens, onde os alelos parentais são transmitidos aos híbridos interespecíficos com características de uma herança mendeliana clássica (You et al., 2009; Kang et al., 2011). São especialmente úteis em análises onde não existem marcadores de regiões mais conservadas disponíveis para as espécies e em casos onde os objetivos buscam integrar análises genético populacionais e a identificação de hibridação na natureza.

Com o crescente desenvolvimento de métodos analíticos e programas estatísticos, um avanço no campo da genética populacional tem sido o desenvolvimento de novas análises que não eram viáveis utilizando apenas marcadores conservados (Hansen et al., 2001). Entre estas análises estão os métodos de atribuição ou agrupamento dos indivíduos, que podem identificar híbridos e introgressão em populações selvagens de forma eficiente utilizando informações de frequências alélicas, verificar divergências genéticas interespecíficas, identificar desequilíbrios populacionais relacionados a eventos de hibridação ou introgressão, atribuir indivíduos a suas populações de origem, entre outras análises (Hansen et al., 2001; Ostberg e Rodriguez 2004; Manel et al., 2005; Roques et al., 1999; Dubut et al., 2010; Fitzpatrick, 2012; Zhang et al., 2013).

Os microssatélites possuem potencial para definir genótipos únicos o que, junto com a sua relativa facilidade de aplicação e de confiabilidade nas determinações alélicas, os torna marcadores particularmente úteis em estudos que necessitem de identificação individual (Roques et al., 1999). A identificação de espécies pode ser realizada através da comparação das frequências alélicas de duas espécies distintas e verificação dos alelos compartilhados (Roques et al., 1999). Neste caso, a acumulação de mutações pode ter contribuído mais substancialmente para a diferenciação das espécies do que ao observado entre populações do mesmo *taxa*. De posse das frequências alélicas individuais, algumas análises também permitem, por exemplo, a classificação dos espécimes em distintas classes híbridas (F1, F2 ou retrocruzamentos), o que é especialmente importante para documentar a introgressão com precisão (Anderson e Thompson 2002).

Estudos genéticos da hibridação ainda são escassos em populações selvagens de espécies Neotropicais no Brasil. Porém, na última década tem sido verificada uma crescente preocupação sobre os impactos negativos que a hibridação pode estar causando em populações nativas (Toledo-Filho et al., 1994; 1998; Porto-Foresti et al., 2010). Diversos marcadores genéticos têm sido desenvolvidos, especialmente envolvendo espécies de interesse comercial como bagres Pimelodídeos e “peixes redondos” Serrassalmídeos, disponibilizando importantes dados sobre a caracterização cromossômica de espécies e híbridos (Hashimoto et al., 2009; Prado et al., 2012b, Hashimoto et al., 2013b) e marcadores moleculares espécie-específicos (Hashimoto et al., 2011a; Prado et al., 2011a; Porto-Foresti et al., 2013). Porém, para as espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* existe apenas um marcador nuclear desenvolvido para a identificação de seus híbridos (Prado et al., 2011a), o que limita as análises de hibridação introgressiva neste grupo de peixes.

1.5 Justificativa

As espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. reticulatum* estão amplamente distribuídas por rios da América do Sul e apresentam incontestável importância ecológica e econômica. Como seus híbridos são férteis, torna-se necessário o desenvolvimento de um conjunto de marcadores genéticos nucleares para determinar os graus de introgressão nas suas populações naturais. Neste sentido, marcadores de genes, sem variação intraespecífica, serão importantes para a identificação precisa dos indivíduos, enquanto análises de frequências alélicas, utilizando microssatélites podem contribuir com *loci* adicionais para análises de diversidade, estrutura populacional e hibridação neste grupo de peixes. Além disso, o estudo da hibridação entre estas espécies pode propiciar uma importante oportunidade para investigar as divergências alélicas entre *P. reticulatum* e *P. corruscans*, além de possibilitar inferências sobre a conservação de suas populações e ações de manejo adequadas.

1.6 Objetivos

1) Desenvolver marcadores de genes nucleares para a distinção entre as espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*, úteis para identificar seus híbridos F1 e avançados;

- 2) Realizar uma avaliação genética da ocorrência de híbridos e introgressão genética em populações selvagens destas espécies;
- 3) Isolar e caracterizar novos microssatélites para a espécie *P. reticulatum* e testar a transferabilidade dos *loci* em *P. corruscans*;
- 4) Realizar análises genético populacionais para avaliar a diversidade genética intra e interpopulacional destas espécies em rios das bacias hidrográficas do Paraná e Paraguai (bacia do Prata, América do Sul);
- 5) Testar a eficácia dos microssatélites na diferenciação interespecífica e identificação de seus híbridos através de análises bayesianas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem de material biológico

Foram analisadas geneticamente amostras de material biológico (nadadeira ou sangue) de indivíduos adultos das espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans* (Figura 1). As amostras foram provenientes das bacias do Tocantins/Araguaia, Paraná, Paraguai e Uruguai (bacia do Prata), América do Sul. A nomenclatura *P. reticulatum* foi utilizada de acordo com o descrito por Buitrago-Suárez e Burr (2007), mas esta espécie também pode ser referida como *P. fasciatum* (*sensu lato*) (Carvalho-Costa et al., 2011).

As amostras de *P. reticulatum* totalizaram 319 indivíduos provenientes de 15 pontos de coleta nos rios Araguaia (Bacia do Tocantins/Araguaia), Paraguai, Cuiabá, São Lourenço, Taquari, Negro, Aquidauana, Miranda (Bacia do Paraguai), Mogi-Guaçu, Paranapanema, Iguazu e Paraná (Bacia do Paraná) (Tabela 1, Figura 3). As amostras de *P. corruscans* compuseram um total de 562 exemplares provenientes de 18 pontos de coleta distribuídos pelos rios Paraguai, Cuiabá, São Lourenço, Taquari, Negro, (Bacia do Paraguai), Mogi-Guaçu, Verde, Ivinhema, Paranapanema, Iguazu, Paraná (Bacia do Paraná) e Uruguai (Bacia do Uruguai) (Tabela 1, Figura 3).

Entre os peixes coletados no rio Mogi-Guaçu, 15 apresentaram uma morfologia externa duvidosa, o que inviabilizou inferências sobre sua identificação visual. Foram verificados exemplares com má formação, padrões de manchas da pele intermediário ou misturado entre as espécies (Tabela 1, Figura 2). Assim, estes peixes foram provisoriamente classificados como possíveis híbridos (Tabela 1).

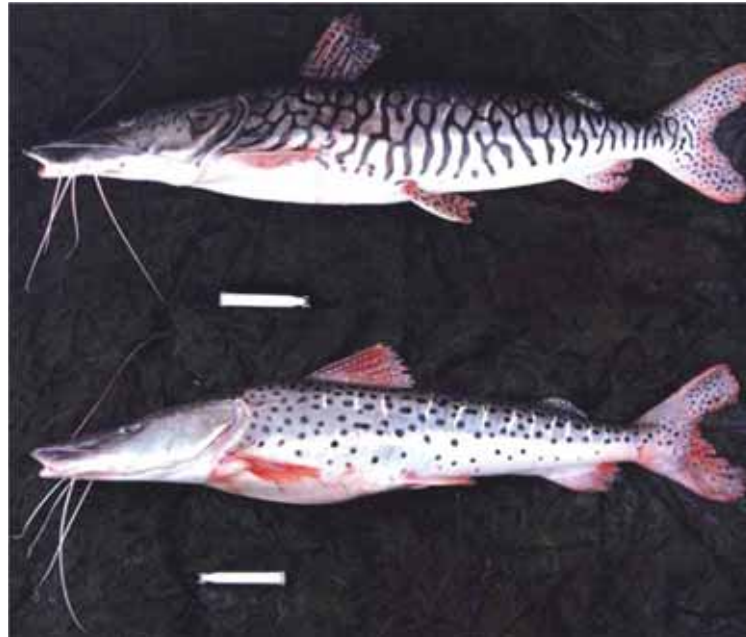


Figura 1. Exemplar de *P. reticulatum* (acima) e *P. corruscans* (abaixo) provenientes da bacia do Paraná, Argentina. Foto de Mark. H. Sabaj. Imagem retirada de Buitrago-Suárez e Burr (2007).



Figura 2. Exemplos coletados no rio Mogi-Guaçu, apresentando características morfológicas intermediárias entre *P. corruscans* (pintas) e *P. reticulatum* (listras) (b, c) ou má formação (a).

Tabela 1. Total de amostras obtidas organizadas por ponto de coleta, os rios onde foram coletadas, bacias hidrográficas, período aproximado de coleta e sua prévia identificação morfológica.

BH	População*		Rio/Município ou local**	Período	N			Total	
					Pc	Pr	H		
Ta	1	Ar	Araguaia	2002-2009	-	24	-	24	
	2	Pa1	Paraguai/Cárceres	1998-2005	32	-	-	32	
	3	Pa2	Paraguai/Corumbá	1998-2005	29	27	-	56	
	4	Pa3	Paraguai/Miranda	2002-2005	18	12	-	30	
	5	Cb1	Cuiabá/Nobres	2002-2005	-	11	-	11	
	6	Cb2	Cuiabá/Poconé, MT	1998-2005	36	30	-	66	
	Pa	7	Sl	São Lourenço/Cuiabá	1998-2005	27	11	-	38
		8	Cb3	Cuiabá3/ParnaPanta	2002-2010	18	42	-	60
		9	Ta1	Taquari/Coxim	1998-2005	30	16	-	46
		10	Ta2	Taquari/Corumbá	1998-2005	28	-	-	28
		11	Ng	Negro	1998-2005	34	23	-	57
		12	Aq	Aquidauana	1998-2005	-	30	-	30
		13	Mir	Miranda	1998-2005	12	41	-	53
APr	14	Pr1	Paraná/Represa de Jupia	2009	51	-	-	51	
	15	Ve	Verde	2008-2011	43	-	-	43	
	16	Mogi	Mogi-Guaçu	2008-2011	14	14	15	43	
Pr	17	Ivi	Ivinhema	2004	19	-	-	19	
	18	Pp	Paranapanema	2003	53	04	-	57	
BPr	19	Ig	Iguaçu	1998-2005	63	14	-	77	
	20	Pr2	Paraná	2011	49	20	-	69	
Ur	21	Ur	Uruguai	2003	06	-	-	06	
Total					562	319	15	896	

BH: Bacias hidrográficas (Ta: Tocantins/Araguaia, Pa: Paraguai, Pr: Paraná, Ur: Uruguai, APr: Alto Paraná, BPr: baixo Paraná), ParnaPanta: Parque Nacional do Pantanal, N: número amostral, Pc: *P. corruscans*, Pr: *P. reticulatum*, H: possíveis híbridos, *1 a 21: pontos de coleta indicados na Figura 3, **Os rios amostrados em mais de um ponto tiveram o município indicado e foram distinguidos através de número em sua sigla correspondente.

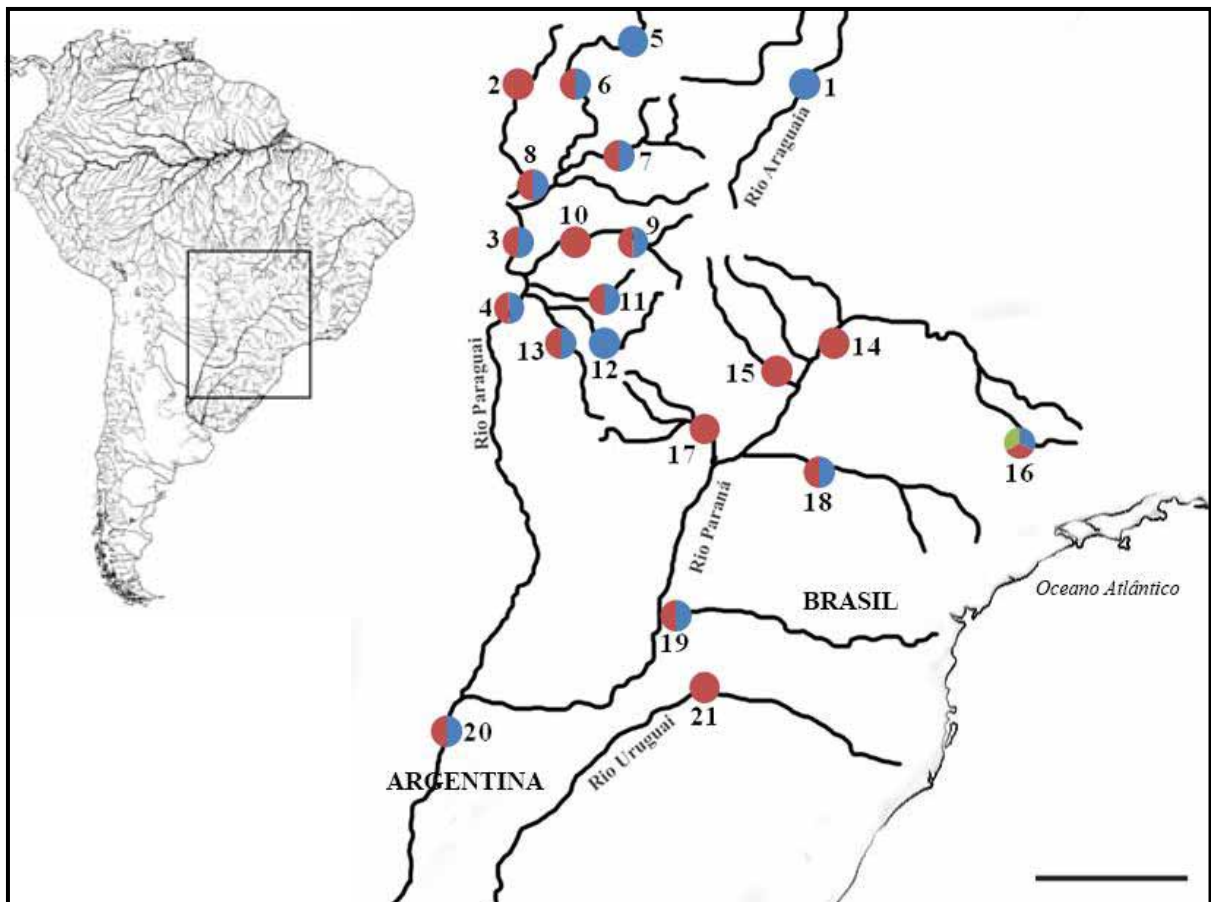


Figura 3. Pontos de amostragem dos peixes em rios da América do Sul. Os locais estão identificados por círculos coloridos que representam onde foram amostradas as espécies *P. reticulatum* (azul), *P. corruscans* (vermelho) e híbridos (verde). Os locais de coleta (1 a 21) e a quantidade de indivíduos coletados estão indicados na Tabela 1. Barra = 300Km.

Os parâmetros utilizados para a identificação das espécies foram os padrões de coloração externa da pele (Buitrago-Suárez e Burr, 2007). A classificação dos indivíduos demonstrada na tabela 1 foi feita de acordo com o indicado pelos pescadores que cederam as amostras (peixes das populações de Pr1, Pr2 e algumas amostras do rio Mogi-Guaçu) e seguindo a identificação prévia estabelecida pelos pesquisadores e laboratórios responsáveis pela concessão do material biológico (amostras da bacia do Tocantins, Paraguai e o restante dos rios da bacia do Paraná) (Tabela 1).

As amostras das bacias do Tocantins, Paraguai e Uruguai e dos rios Ivinhema, Iguazu e Paranapanema foram coletadas durante os anos de 1998 e 2010 e estão mantidas na coleção de peixes e tecidos do Laboratório de Genética de Peixes, UNESP campus de Bauru e no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP campus de Botucatu (Estado de São Paulo, Brasil), enquanto os indivíduos dos rios Paraná (Pr1) Verde e Mogi-Guaçu foram

coletados entre 2008 e 2011 e cedidos por José A. Senhorini da coleção de peixes do CEPTA/ICMBio, Pirassununga (Estado de São Paulo, Brasil). As amostras da de Pr2 (rio Paraná) foram cedidas por Sebastián Sánchez, do Instituto de Ictiología del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, coletadas em 2011 por pescadores no Porto de Antequera (Corrientes, Argentina).

2.2 Extração de DNA

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). Foram utilizados dois protocolos de extração de DNA (protocolos A e B), com algumas modificações de acordo com o tecido utilizado. O protocolo A foi empregado para extração de DNA de sangue, enquanto o protocolo B foi utilizado para amostras de tecidos sólidos como fígado e nadadeira. O DNA genômico total extraído foi quantificado em gel de agarose 1% através da comparação com o padrão do marcador *ladder* Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), que possui peso molecular e concentrações conhecidos.

Protocolo A

- 1 numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml);
- 2 retirar uma pequena quantidade de sangue, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3 adicionar 300 µl de *Cell lysis solution*;
- 4 adicionar 5 µl de *Proteinase K* e vortexar;
- 5 levar ao banho-maria a 55° C por aproximadamente 1 hora; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6 centrifugar por 30 segundos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 7 vortexar o pellet e adicionar 300 µl de *Nuclei lysis solution* e vortexar por 20 segundos;
- 8 centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 9 transferir o sobrenadante para a segunda série de tubo de microcentrífuga contendo 300 µl de isopropanol e misturar por inversão;
- 10 centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 11 adicionar 300 µl de Etanol 70% a temperatura ambiente;
- 12 centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;

- 13 descartar o etanol cuidadosamente virando o tubo;
- 14 deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37° C, por 1 hora;
- 15 adicionar 100 µl de *DNA rehydration solution* por 1 hora a 65° C ou 24 horas a 4°C.

Protocolo B

- 1 numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml);
- 2 retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3 adicionar 600 µl de *Cell lysis solution*;
- 4 adicionar 5 µl de proteinase K e vortexar;
- 5 levar ao banho-maria a 60° C por aproximadamente 2 horas; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6 adicionar 3 µl de RNase e colocar no banho-maria a 37° C por 30 minutos. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 7 adicionar 200 µl de *Protein precipitation solution* e misturar rapidamente no vórtex;
- 8 Levar ao gelo por 5 minutos;
- 9 centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 10 remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente;
- 11 inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA tornem-se visíveis;
- 12 centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente;
- 13 adicionar 600 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo);
- 14 centrifugar por 4 minutos a 13000 rpm;
- 15 deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37° C, por 1 hora;
- 16 adicionar 75 µl de *DNA rehydration solution* por 1 hora a 65° C ou 24 horas a 4°C.

2.3 Desenvolvimento e aplicação dos marcadores moleculares

Foram desenvolvidos três marcadores nucleares (EF1 - *nuclear elongation factor 1 α*, Globina – *β globina*, ribossômico 18S) através das técnicas de PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) e PCR-multiplex, para a identificação

das espécies *P. reticulatum*, *P. corruscans* e seus híbridos. Estes marcadores foram utilizados em conjunto com os marcadores RAG2 (*Recombination activating gene 2*) e mitocondrial 16S (Prado et al., 2011a) previamente desenvolvidos para estas espécies.

Em uma próxima etapa, através de um pirosequenciamento Roche-454, foram desenvolvidos e caracterizados novos marcadores microssatélites para a espécie *P. reticulatum*. Foram feitos testes de transferabilidade para testar a amplificação em *P. corruscans*. Os *loci* mais adequados foram selecionados de acordo com os objetivos de cada etapa do trabalho para serem aplicados na investigação da diversidade, estruturação genética e hibridação em populações destas espécies.

2.3.1 Genes nucleares e mitocondrial

2.3.1.1 Genes EF1, Globina e 18S

Para o desenvolvimento de novos marcadores nucleares, fragmentos dos genes nucleares EF1, Globina e 18S foram amplificados através de PCR utilizando-se pares de *primers forward* (F) e *reverse* (R) para cada região nuclear (Tabela 2).

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

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos genes nucleares e gene mitocondrial.

<i>Primer</i>	Sequencia*	Referências
RAG2 Silu F	CCTGAGTGCTACCTATTCATGGA	Prado et al., 2011a
RAG2 Silu R	CTTGGGAGGAGAGACCATC	
EF1 α 835 F	ATTGGAACCTTACCTGTGG	Moyer et al., 2004
EF1 α 1417 R	CAGCCTTCTGTGCAGACTT	
NS1 F	GTAGTCATATGCTGTCTC	White et al., 1990 <i>presente trabalho</i>
18S Silu R	CCATCGAAAATTGATAGGG	
Glob Silu F	TCAATATGGTTCATGGACAGA	<i>presente trabalho</i>
Glob Silu R	CCAGAAGCTGAAAGTAGACAGT	
16S F	ACGCCGTTTATCAAAAACAT	Palumbi, 1996
16S R	CCGGTCTGAACTCAGATCCGT	

*Sequência na ordem de 5' para 3', Silu: Siluriformes, F:*Forward*, R:*Reverse*.

2.3.1.2 Purificação dos produtos amplificados por PCR

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

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

2.3.1.3 Reação de amplificação para o sequenciamento

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

2.3.1.4 Limpeza dos fragmentos marcados

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

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

As sequências foram determinadas no sequenciador automático ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer) e posteriormente foram depositadas no GenBank do National Center of Biotechnology Information (NCBI).

2.3.1.5 PCR-RFLP

As regiões sequenciadas dos genes Globina, EF1 e 18S foram submetidas ao programa NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) para gerar mapas de restrição, tornando possível encontrar enzimas específicas para as espécies parentais analisadas. Os produtos do PCR foram submetidos à restrição enzimática em um volume final de 8 µl contendo 5 µl dos produtos de PCR, tampão da enzima 1X e 5 unidades de enzima de restrição (10 U/µl) (New

England Biolabs Inc.). O material das reações foi incubado por 2 horas de acordo com a temperatura ideal de cada enzima.

2.3.1.6 PCR-Multiplex

As sequências parciais dos genes Globina e EF1 foram alinhadas através do programa ClustalW (Thompson et al., 1994) implementado no programa BIOEDIT (Hall, 1999) para verificar pontos de mutação, a partir dos quais foram desenhados os *primers* espécie-específicos. As condições ideais dos *primers* foram analisadas através do programa NetPrimer disponível no site do PREMIER Biosoft International <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>>.

Para as amplificações multiplex foram utilizados, na mesma reação, tanto os *primers forward* e *reverse* (Tabela 2) como os *primers* espécie-específicos desenvolvidos para as espécies parentais, de acordo com o gene a ser analisado. As reações inicialmente foram realizadas em uma concentração de aproximadamente 150 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X, 0.5 unidades de *Taq polymerase* (Invitrogen), 0.1 a 0,4 μ M de cada *primer* e 10-50 ng de DNA genômico (total de 25 μ l). As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) basicamente sob as condições de desnaturação a 95°C por 40s, hibridização de 50 a 58°C por 40s e extensão a 72°C por 10 a 20s, com 35 repetições.

Para os genes onde foram desenvolvidas ambas as técnicas, a PCR-multiplex foi utilizada em primeiro lugar, seguida pela PCR-RFLP em análises subsequentes para confirmação dos resultados. Três amostras de DNA de cada espécie parental, previamente identificadas como puras, foram utilizadas como controle de especificidade de todas as reações. Os fragmentos de DNA das análises PCR-multiplex e PCR-RFLP foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (1 ng/ml) ou SYBR Safe™ (Applied Biosystems), utilizando o DNA *ladder* de 1 Kb (Invitrogen).

2.3.1.7 Genes RAG2 e 16S

Na PCR-RFLP os fragmentos de genes RAG2 e 16S foram amplificados por PCR utilizando os *primers* descritos na tabela 2 e utilizando as enzimas Sau96I (RAG2) e SmlI (16S) seguindo as mesmas etapas de clivagem enzimática (tópico 2.3.1.5). No multiplex-PCR,

além dos iniciadores para cada gene (Tabela 2), foram utilizados os *primers* espécie-específicos RAG2Pc R (5'-AACTCCAGGTCAATGAGATAAATG-3') e RAG2Pr R (5'-CAGTTCCAGGTCTCTGTGGTT-3') para o gene RAG2 e 16SPc F (5-TGACCATAAAGATCCGGCTAT-3') e 16SPr R (5'-TCTTGGTTTTGGGGTTGTTA-3') para o gene 16S (Prado et al., 2011a). As condições dos programas e concentração das ampliações por PCR seguiram o indicado por Prado et al. (2011a) enquanto a análise em gel de agarose seguiu as mesmas etapas descritas anteriormente.

2.3.2 Microssatélites

2.3.2.1 Análise das sequências e seleção dos microssatélites

O DNA genômico total de três indivíduos da espécie *P. reticulatum* foi analisado em sequenciador Roche 454 GS FLX com plataforma Titanium Genome sequencer 20 System (Instituto Agrobiotecnológico de Rosário – INDEAR, Argentina). Detalhes sobre a técnica de pirosequenciamento estão descritas em Margulies et al. (2005).

Após o sequenciamento foram obtidas aproximadamente 80.000 sequências de DNA, que foram analisadas a fim de identificar os fragmentos mais adequados para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites. Em uma primeira busca foram selecionadas manualmente cerca de 400 sequências de 250 a 500 pares de bases (pb) contendo microssatélites perfeitos do tipo dinucleotídeos (com oito repetições ou mais) tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (com um mínimo de cinco repetições) e que apresentassem um tamanho suficiente para o desenho de *primers* nas regiões flangeadoras das repetições. As sequências reversas e complementares de cada fragmento foram obtidas através do programa Reverse Complement disponível em http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html.

Foram desenhados 40 pares de *primers* com o auxílio do programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) observando-se os seguintes critérios: serem constituídos de 18 a 22 pares de bases, estar a uma distância adequada dos microssatélites (de 10 a 50pb), com temperaturas de anelamento similares entre os *primers forward* e *reverse* (entre 55 e 62° C) e apresentando menores taxas de complementaridade ou formação de dímeros. Os *loci* foram denominados Prt como referência ao nome da espécie *P. reticulatum*, abreviando-se o nome do gênero (P) e da espécie (rt), seguido de número correspondente à ordem com que foram desenhados.

A eficácia de amplificação dos 40 pares de *primers* foi testada em quatro exemplares de *P. reticulatum* e quatro indivíduos de *P. corruscans*. O PCR foi conduzido em reações com um volume final de 15 µl contendo 100 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X, 0.5 unidades de *Taq* (Applied Biosystems), 0.67 µM de cada *primer* e 30 ng de DNA genômico. As condições de amplificação foram de 10 minutos a 95°C, seguidos de 34 ciclos de 45 s a 94°C, 50 s a 58°C e 50 s a 72°C, com uma extensão final de 72°C por 10 min em um termociclador Veriti™ (Applied Biosystems). Os produtos foram visualizados em gel de agarose 2.5% utilizando o DNA ladder 100 pb (Invitrogen) e SYBR Safe™ (Applied Biosystems).

Entre as amplificações positivas foram selecionados 16 microssatélites considerando critérios úteis para a identificação de híbridos e estudos de diversidade como: bons resultados de PCR utilizando a mesma temperatura de anelamento (requisito para a posterior amplificação simultânea de diversos *primers* em reações de PCR-multiplex), especificidade, alto polimorfismo e diferenças de tamanho entre os alelos das espécies.

2.3.2.2 Caracterização dos microssatélites em *P. reticulatum* e *P. corruscans*

Para a caracterização e o estabelecimento dos 16 *loci* microssatélites desenvolvidos para *P. reticulatum*, foram genotipados 22 indivíduos desta espécie provenientes da população Cb2, rio Cuiabá, Bacia do Paraguai (Tabela 1). Os testes de amplificação cruzada, ou transferabilidade, foram conduzidos em uma mescla de 12 espécimes de *P. corruscans* coletados de quatro populações diferentes nas bacias do Paraguai e Paraná: Cb3 (N=4), Ng (N=2), Ve (N=3) e Pr2 (N=3) (Tabela 1). Além disso, com a intenção de obter uma ampla representação da diversidade e divergência genética dos microssatélites a serem estabelecidos para ambas as espécies, foram adicionados às análises 20 indivíduos de *P. reticulatum* provenientes de oito populações distintas das bacias do Paraguai e Paraná: Pa2 (N=3), Cb3 (N=4), Taq1 (N=3), Ng (N=2), Mir (N=2), Pp (N=3) e Pr2 (N=3) (Tabela 1).

Nas reações de PCR-multiplex os 16 *loci* foram organizados em grupos de 4 pares de *primers* de acordo com o tamanho dos seus fragmentos e cor com que seriam marcados, a fim de possibilitar a distinção de seus alelos durante a análise automática. As reações tiveram um volume final de 10 µl contendo 5 µl de Mix para PCR (Quiagen Master mix - 100 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X, 0.5 unidades de *Taq*, 0.4 µM de cada *primer reverse*, 0.4 µM de cada *primer forward* marcado com fluorescência (NED - amarelo, VIC -

verde, Pet - vermelho ou 6-FAM - azul) (Applied Biosystems) e 30 ng de DNA genômico. O programa foi de 15 min a 95°C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 60°C por 30 min em um termociclador Veriti™ (Applied Biosystems).

As amplificações foram confirmadas em gel de agarose a 1% agarose utilizando o DNA ladder de 100 bp DNA ladder (Invitrogen) corado com SYBR Safe™ (Applied Biosystems) e posteriormente aplicadas em analisador genético automático ABI PRISM_3730 (Applied Biosystems). O tamanho dos alelos foram estabelecidos e marcados utilizando o programa Gene Mapper 3.7 (Applied Biosystems). As sequências dos *primers* foram depositadas no GenBank do NCBI.

2.3.3 Avaliação de híbridos e introgressão utilizando genes nucleares e mitocondrial

Inicialmente os indivíduos de todas as populações coletadas (Tabela 1) foram identificados através dos padrões de banda diagnósticos dos marcadores de genes nucleares (RAG2, Globina, EF1 e 18S) e mitocondrial 16S. As espécies parentais foram as que apresentaram os marcadores monomórficos espécie-específico. Os exemplares que possuíam marcadores de ambas as espécies para um ou mais genes nucleares ou gene mitocondrial foram inicialmente categorizados como híbridos.

Em uma segunda etapa, foram analisados os genótipos individualmente na tentativa de identificar a qual linhagem parental ou híbrida os indivíduos pertenciam. Os híbridos F1 foram os que apresentaram bandas de ambas as espécies, ou heterozigotas, para todos os marcadores nucleares. Os híbridos com marcadores nucleares variáveis entre as espécies ou diferenças entre o marcador mitocondrial e nucleares foram categorizados como híbridos avançados.

Utilizando o marcador mitocondrial foi possível identificar o parental materno *P. corruscans* ou *P. reticulatum*, categorizar os híbridos F1 como cruzamentos entre fêmea de *P. reticulatum* e macho de *P. corruscans* (F1 "cachapinta" ou PrPc) ou entre fêmea de *P. corruscans* e macho de *P. reticulatum* (F1 "pintachara" ou PcPr) e verificar a direção dos cruzamentos avançados.

Posteriormente, foi utilizado o programa NewHybrids 1.1 (Anderson e Thompson, 2002) para verificar a probabilidade (Q) de cada indivíduo pertencer a uma das seis classes: parental 1 *P. reticulatum* (Pr), parental 2 *P. corruscans* (Pc), primeira geração de híbridos

interespecíficos (F1), segunda geração de híbridos (F2), retrocruzamentos de F1 com o parental 1 (R_{PR}) ou retrocruzamentos de F1 com o parental 2 (R_{PC}). Os testes foram baseados em 100.000 varreduras MCMC após um período de *burn-in* de 100.000. Os híbridos que não puderam ser identificados através desta abordagem foram classificados em uma única categoria como híbridos avançados (H_A).

2.3.4 Aplicação dos microssatélites no estudo das populações naturais

Indivíduos das populações parentais e locais com ocorrência de híbridos foram genotipados através de 10 microssatélites (Prt3, 5, 11, 12, 25, 27, 30, 34, 36 e 39). Estes *loci* foram escolhidos por apresentarem altos valores de polimorfismo, estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não apresentarem indícios de alelos nulos e por possuírem diferentes tamanhos de alelos entre as espécies (utilizados para os estudos de hibridação).

As populações das espécies parentais foram provenientes de rios das bacias do Paraguai e Paraná, totalizando 119 amostras de *P. reticulatum* provenientes de seis populações dos rios Paraguai (Pa2), Cuiabá (Cb2), Taquari (Ta1), Negro (Ng), Miranda (Mir) (Bacia do Paraguai) e Paraná (Pr2) (Bacia do Baixo Paraná). As amostras de *P. corruscans* compuseram um total de 202 exemplares provenientes de sete populações dos rios Paraguai (Pa2), Cuiabá (Cb2), Taquari (Ta1), Negro (Ng), (Bacia do Paraguai), Verde (Ve), Paranapanema (Pp) (Bacia do Alto Paraná) e Paraná (Pr2) (Bacia do Baixo Paraná) (Tabela 1, Figura 1). Estas localidades foram eleitas por apresentarem um maior número de indivíduos coletados e por abrangerem áreas distantes geograficamente, o que pode ser útil para verificar os padrões de estruturação ou diferenciação entre as populações de cada espécie. Também foram genotipados indivíduos das populações de Aquidauana (N=30) e Mogi-Guaçu (N=43).

As amplificações foram feitas através de dois PCRs-multiplex utilizando cinco pares de *primers* em cada reação (Multiplex 1: Prt3, 12, 25, 11 e 34; Multiplex 2: Prt36, 5, 27, 30 e 39). As reações seguiram as mesmas etapas, concentrações e programas descritos no item 2.3.2.2.

2.3.4.1 Diversidade e estruturação em populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans*

Para cada espécie foram estabelecidos os valores alélicos totais e médios por *locus* e por população. O número de indivíduos analisados, número de alelos e valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram obtidos através do programa Cervus

3.0 (Marshall et al., 1998). Riqueza alélica foi obtida através do programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Os valores de Fis (coeficiente de endogamia) e os cálculos de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e desequilíbrio de ligação foram analisados através de testes exatos de Fisher, implementados no programa GenePop 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Para verificar a ocorrência de alelos nulos utilizou-se o programa Micro-checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Os valores de significância ($P < 0.05$) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Para investigar a ocorrência de estruturação genética entre as populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans* foram obtidos os índices de Fst (Weir e Cockerham, 1984) assumindo o modelo de alelos infinitos (IAM) para todos os *loci* e para todas as populações no programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005). Neste mesmo programa foram realizados testes de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para verificar a distribuição da variação entre populações, grupos de populações e dentro de populações. As significâncias foram testadas por 1000 permutações.

Nos testes de AMOVA, as amostras de *P. reticulatum* foram analisadas de duas formas: primeiro com todos os indivíduos como um único grupo; e posteriormente separadas em dois grupos (um grupo com os indivíduos da bacia do Paraguai e outro grupo com as amostras do Baixo Paraná). Para *P. corruscans* estas análises foram conduzidas de duas maneiras: um único grupo composto por todas as populações; e dois grupos (um grupo com as populações da bacia do Paraguai+Baixo Paraná e outro com amostras do Alto Paraná).

Análises bayesianas foram conduzidas através do programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) para verificar o número real de populações (K) entre as amostras de cada espécie. Foi permitido o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture model*) a fim de permitir uma resolução máxima, uma vez que este parâmetro assume que cada indivíduo vem exclusivamente de uma das populações (K) e é mais indicado para verificar uma estruturação populacional sutil (Pritchard et al., 2000). Foram utilizados alelos correlacionados, 20 réplicas para cada valor de K, 500.000 gerações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com períodos de “burn-in” de 200.000, e assumindo K=2 a 12 em *P. corruscans* e K=2 a 11 em *P. reticulatum*. Posteriormente, para visualizar a extensão dos genótipos compartilhados entre as populações (*q*), foram feitas novas análises com 20 réplicas para K=2, admixture mode, 500.000 cadeias MCMC, e período de “burn in” de 100.000.

2.3.4.2 Diferenciação entre as espécies

A fim de visualizar as diferenças alélicas interespecíficas, as populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans* sem ocorrência de hibridação foram agrupadas por espécie. A diversidade genética e diferenças dos alelos entre as espécies foram medidas através do número de alelos, riqueza alélica, variação de tamanho dos alelos e valores de H_o e H_e para cada microssatélite. Foram utilizados os programas citados no tópico anterior.

A divergência relacionada à variação e frequência dos alelos entre as espécies foi medida através do índice F_{st} utilizando o programa Arlequin 3.11. Através deste mesmo programa também foram feitas análises de AMOVA para acessar a variação entre as espécies e entre as populações dentro de cada espécie. Também foram obtidos valores de R_{st} (Rousset, 1996; Goodman, 1997) que consiste em uma variação dos índices de diferenciação genética com base no tamanho alélico, implementado no programa GenePop 3.4. As frequências alélicas para todos os *loci* por espécie foram obtidas através do programa Fstat 2.9.3.2.

A fim de verificar o número real de K entre todas as amostras ($N=394$) e visualizar o número de grupos diferenciados entre as espécies parentais e as populações com híbridos, o valor de K foi estimado através do programa Structure2.3.4 assumindo ancestralidade misturada, alelos correlacionados, testados valores de $K=2$ a 10, 20 réplicas para cada valor de K , 500.000 cadeias MCMC e 100.000 gerações “*burn-in*”.

2.3.4.3 Identificação de híbridos e introgressão genética

Foram obtidos dados de diversidade genética nas populações com híbridos (A , A_r , variação de tamanho dos alelos, H_o e H_e) e verificados possíveis desvios do EHW, alelos nulos e desequilíbrio de ligamento entre os *loci* utilizando os parâmetros e programas descritos anteriormente. Os valores de significância ($P<0.05$) para estes testes foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Posteriormente foram realizados testes para verificar as probabilidades de identificação de híbridos F1 e híbridos avançados em populações naturais de *P. reticulatum* e *P. corruscans* com ocorrência de híbridos (rio Aquidauana e Mogi-Guaçu) utilizando análises bayesianas. Foram feitos testes utilizando somente os marcadores variáveis microssatélites (8 *loci* - Prt3, 5, 12, 25, 27, 30, 36 e 39); utilizando os microssatélites junto com marcadores dos genes RAG2, EF1 e gene ribossômico 18S ou utilizando apenas os microssatélites que se

mostraram totalmente diagnósticos entre as espécies junto com os marcadores dos genes RAG2, EF1 e 18S.

O programa Structure 2.3.4 foi utilizado para acessar os valores de q de cada indivíduo atribuído a cada espécie parental, *P. reticulatum* ou *P. corruscans*. Foi estimado $K=2$, ancestralidade misturada, 20 réplicas para cada valor de K , 500.000 cadeias MCMC, 100.000 gerações “burn-in” e utilizando a opção “popflag” para as espécies parentais (1: *P. reticulatum*, 2: *P. corruscans* e 0: populações com hibridação). O programa NewHybrids 1.1 (Anderson e Thompson, 2002) foi utilizado para estimar a probabilidade total (Q) de cada indivíduo pertencer a uma das seis classes: parental 1 *P. reticulatum* (Pr), parental 2 *P. corruscans* (Pc), primeira geração de híbridos interespecíficos (F1), segunda geração de híbridos (F2), retrocruzamentos de F1 com o parental 1 (R_{PR}) ou retrocruzamentos de F1 com o parental 2 (R_{PC}). Os testes foram baseados em 100.000 varreduras MCMC após um período de burn-in de 100.000, com as opções de z e s para indicar as espécies puras ($z0s$: *P. reticulatum* e $z1s$: *P. corruscans*). Esta classificação foi realizada utilizando os marcadores que permitiram uma melhor identificação dos indivíduos testados através do programa Structure. Foi utilizado um índice de confiança de 90% para discriminar os indivíduos como espécies parentais, sendo que os exemplares com valores menores de atribuição a determinada espécie ($0.1 \leq q \leq 0.9$) foram identificados como indivíduos com algum nível de mistura entre as espécies.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão referentes ao desenvolvimento e caracterização dos marcadores genéticos nucleares estão apresentados na forma de dois artigos: “*Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture*” (publicado na revista *Aquaculture Research*) e “*Development and characterization of 16 microsatellites loci in the Neotropical catfish Pseudoplatystoma reticulatum and cross-species analysis in P. corruscans: tools for population genetics and hybridization studies*” (enviado para publicação na revista *Conservation Genetics*) (Apêndices).

Os resultados e discussão relacionados à aplicação destes marcadores nos estudos de diversidade genética, estruturação e hibridação encontram-se na forma de três capítulos:

Capítulo 1.

Avaliação genética da hibridação entre os bagres *Pseudoplatystoma reticulatum* e *P. corruscans* revela introgressão genética na natureza

Capítulo 2.

Diversidade e estruturação genética em populações dos peixes migradores Neotropicais *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma corruscans* em rios das bacias do Paraguai e Paraná

Capítulo 3.

Microsatélites e genes na detecção de hibridação entre duas espécies do gênero *Pseudoplatystoma* através de análises bayesianas

CAPÍTULO 1

Avaliação genética da hibridação entre os bagres *Pseudoplatystoma reticulatum* e *P. corruscans* revela introgressão genética na natureza

RESUMO

A hibridação interespecífica em peixes tem aumentado rapidamente devido a ações antrópicas como alterações ambientais, introdução de espécies e a produção de híbridos na aquicultura. No Brasil ainda são escassos os estudos que envolvam a análise do ambiente natural em relação à ocorrência de híbridos e retrocruzamentos em populações de espécies nativas. Como tem sido relatada a presença de híbridos dos bagres *Pseudoplatystoma reticulatum* e *P. corruscans* na natureza, este trabalho buscou realizar uma avaliação da ocorrência de hibridação e introgressão genética em populações destas espécies distribuídas pelas bacias do Tocantins, Uruguai, Paraná e Paraguai (América do Sul), utilizando marcadores genéticos (três genes nucleares e um gene mitocondrial). Em 12 rios não foram observados híbridos, mesmo em populações onde as espécies ocorrem em simpatria, indicando que possivelmente a hibridação natural é rara entre estas espécies. No Rio Paraná (Bacia do Alto Paraná) dois híbridos F1 estavam presentes na população amostrada (3.92 %). Já no rio Aquidauana (Bacia do Paraguai) foram observados altos níveis de híbridos (50.00 %), sendo que poucos foram F1 e a maioria correspondeu a retrocruzamentos com *P. reticulatum*. No rio Mogi-Guaçu (Bacia do Alto Paraná) foi evidenciada a possível introdução da espécie *P. reticulatum*, além de uma população apresentando 44.19 % de híbridos, composta por ambas as gerações F1 recíprocas e retrocruzamentos com *P. reticulatum*. Estes dados indicam que a introgressão entre estas espécies está ocorrendo em rios brasileiros, possivelmente devido à escapes e introduções de híbridos de pisciculturas. Como são férteis, as linhagens avançadas podem ser tanto provenientes de cultivo como estarem se reproduzindo na natureza. Todos os peixes coletados eram adultos, o que demonstra que os híbridos F1 e as linhagens avançadas (retrocruzamentos) entre estas espécies sobrevivem e possivelmente estão permanecendo em populações de ocorrência destas espécies. Discussões sobre a eficácia dos marcadores para detectar hibridação e possíveis ações de conservação também são apresentados.

INTRODUÇÃO

Populações selvagens de peixes tem sofrido alterações ecológicas e genéticas ocasionadas por diversos fatores antrópicos como a pesca excessiva, poluição, construção de barragens, introdução de espécies, hibridação interespecífica entre espécies nativas e exóticas e hibridação ocasionada por escapes e introduções de indivíduos cultivados (Scribner et al., 2001; Metcalf et al., 2008; Allendorf et al., 2010; Porto-Foresti et al., 2010).

O cruzamento interespecífico pode não constituir ameaças ecológicas quando intimamente relacionada aos processos evolutivos das espécies durante a sua história biológica e geralmente ser caracterizada pela ocorrência de eventos esporádicos de hibridação entre espécies simpátricas, resultando na formação de zonas híbridas limitadas a determinadas regiões (Arnold et al., 1999; Barton, 2001; Mallet, 2005; Willis et al., 2012). Mesmo em pequena escala, a hibridação natural pode contribuir em processos adaptativos e de especiação durante a evolução de muitos grupos animais (Arnold et al., 1999; Mallet, 2007; Willis et al., 2012; Abbott et al., 2013)

Porém, a hibridação não natural, ou ocasionada pelo homem, está ocorrendo de forma muito rápida, e é considerada uma das principais ameaças para a conservação de espécies selvagens (Rhymer e Simberloff, 1996; Allendorf et al., 2001; Allendorf et al., 2010; Lamer et al., 2010). Quando os genomas de espécies distintas se misturam através da hibridação e introgressão genética (ou seja, quando alelos são transferidos entre as espécies através de retrocruzamentos), pode ocorrer a perda de alelos ou o rearranjo de combinações gênicas previamente existentes e que provavelmente podem nunca mais ser recriadas, resultando no desaparecimento de adaptações a determinados ambientes (Laikre et al., 1999). Os híbridos F1 (primeira geração filial ou híbridos interespecíficos) estéreis podem competir ecologicamente com as espécies parentais ou, caso sejam férteis, alterar a composição genética das populações através de introgressão (Toledo-Filho et al., 1994, 1998).

Uma prática indicada para avaliar os efeitos genéticos da hibridação em populações selvagens é o monitoramento ou avaliação genética, que permite verificar a ocorrência de híbridos F1 e introgressão através da identificação dos indivíduos utilizando marcadores genético-moleculares (Toledo-Filho et al., 1998; Allendorf et al., 2001; 2010; Jolly et al., 2011). Estas análises representam um dos meios mais efetivos para verificar quando as populações atingem limiares críticos que necessitem medidas de gestão (Allendorf et al., 2010; Schwartz et al., 2007).

Os estudos sobre hibridação introgressiva em espécies nativas de peixes ainda são escassos no Brasil. Contudo, atualmente tem sido verificada uma crescente preocupação sobre os impactos biológicos da hibridação (Toledo-Filho et al., 1994; 1998; Porto-Foresti et al., 2010) e diversos marcadores genéticos tem sido desenvolvidos para a identificação de híbridos, especialmente para espécies de interesse comercial como bagres Pimelodídeos e “peixes redondos” Serrassalmídeos (Hashimoto et al., 2011a; Prado et al., 2011a, Hashimoto et al., 2013a; Porto-Foresti et al., 2013; Carvalho et al., 2013).

Os bagres Neotropicais, *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma corruscans* são peixes migradores (Lundberg e Littman et al., 2003) e de alto valor econômico no Brasil. Estas espécies tem sido intensivamente utilizadas na produção de híbridos interespecíficos em pisciculturas brasileiras (Crepaldi et al., 2006; Campos, 2010; Porto-Foresti et al., 2010; Hashimoto et al., 2013a). Embora os adultos híbridos F1 possam ser parcialmente identificados através do seu padrão de manchas na pele (intermediário entre as espécies, com pontos e listras), os alevinos e juvenis são muito parecidos com as espécies puras (Campos, 2010; Porto-Foresti et al., 2010). Além disso, estes híbridos são férteis (Prado et al., 2012b; José A. Senhorini, comunicação pessoal), e tem sido equivocadamente utilizados como reprodutores em pisciculturas, resultando na produção de linhagens híbridas avançadas com altas taxas de mortalidade e de difícil identificação morfológica (Hashimoto et al., 2013a).

Embora não existam estudos que indiquem a formação de híbridos naturais ou zonas híbridas entre estas espécies, nas últimas décadas tem sido relatada a presença de seus híbridos na natureza. Veríssimo et al. (2005) capturaram um híbrido “*P. corruscans* x *P. fasciatum*” no rio Manso (bacia do Paraguai) durante o período de 2000 a 2005, o qual foi identificado através de parâmetros morfológicos. Bignotto et al. (2009) também observaram um exemplar híbrido destas espécies na planície de inundação do rio Paraná (bacia do Alto Paraná), utilizando marcadores genéticos ISSR (*Inter simple sequence repeat*) e DNA mitocondrial. Outro estudo, utilizando dois marcadores genéticos (um gene nuclear e um gene mitocondrial) demonstraram a ocorrência de híbridos F1 destas espécies nos rios Aquidauana, Paraná, Mogi-Guaçu, e um híbrido avançado no rio Mogi-Guaçu (Prado et al., 2012a). Possivelmente, o manejo inadequado destes híbridos em pisciculturas seja o principal responsável pela sua dispersão em rios brasileiros através de introduções e escapes (Bignotto et al., 2009; Porto-Foresti et al., 2010; Prado et al., 2012a).

Até o momento, a hibridação foi investigada em poucos rios de ocorrência das espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans*. Também não existem dados sobre os níveis de hibridação introgressiva em suas populações. Assim, este trabalho objetivou utilizar um conjunto de cinco marcadores genético moleculares para avaliar a ocorrência e frequência de híbridos e introgressão genética em rios das Bacias do Tocantins/Araguaia, Paraguai, Paraná e Uruguai (Brasil e Argentina, América do Sul).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 304 indivíduos de *P. reticulatum*, provenientes de 15 pontos de coleta nos rios Tocantins (Bacia do Tocantins/Araguaia), Paraguai, Cuiabá, São Lourenço, Taquari, Negro, Aquidauana, Miranda (Bacia do Paraguai), Mogi-Guaçu, Paranapanema, Iguazu e Paraná (Bacia do Paraná); e 462 exemplares indivíduos da espécie *P. corruscans*, provenientes de 18 pontos de coleta distribuídos pelos rios Paraguai, Cuiabá, São Lourenço, Taquari, Negro (Bacia do Paraguai), Mogi-Guaçu, Verde, Ivinhema, Paranapanema, Iguazu, Paraná (Bacia do Paraná) e Uruguai (Bacia do Uruguai) (Tabela 3, Figura 1). Quinze peixes coletados no rio Mogi-Guaçu foram previamente classificados como possíveis híbridos pois apresentaram características morfológicas intermediárias entre as espécies (Figura 1).

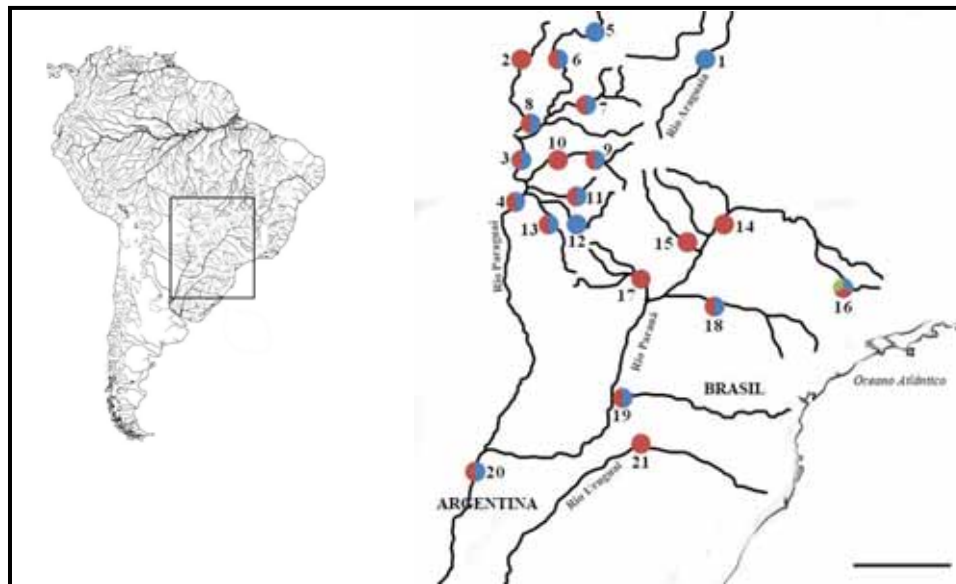


Figura 1. Pontos de amostragem dos peixes em rios da América do Sul. Os locais estão identificados por círculos coloridos que representam onde foram amostradas as espécies *P. reticulatum* (azul), *P. corruscans* (vermelho) e híbridos (verde). Os locais de coleta (1 a 21) e a quantidade de indivíduos coletados estão indicados na Tabela 3. Barra = 300 Km.

Extração de DNA e marcadores moleculares

Para a extração do DNA foram utilizados os métodos descritos no kit comercial Wizard genomic DNA purification kit (Promega). A identificação genética dos animais foi conduzida utilizando quatro marcadores nucleares (RAG2 - *recombination activating gene 2*, EF1 - *nuclear elongation factor 1 α* , Globina - *β globina* e ribossômico 18S) e o marcador mitocondrial 16S (Prado et al., 2011a; Hashimoto et al., 2013a).

Os marcadores foram obtidos utilizando-se as técnicas de PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*) e PCR-multiplex. No PCR-RFLP, os fragmentos de cada gene foram amplificados utilizando seus respectivos pares de *primers forward* (F) e *reverse* (R) (Tabela 2). As amplificações possuíram basicamente um volume total de 25 μ l contendo 150 μ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 50 mM KCl), 0.5 unidades (U) da enzima *Taq polymerase* (Invitrogen), 0.1 μ M de cada *primer* e 10-50 ng de DNA genômico. Foi utilizado um programa de desnaturação a 95°C por 40s, hibridização de 52°C por 40s, extensão a 72°C por 20s (35 repetições.) e uma extensão final de 7 minutos. A restrição enzimática ocorreu em um volume final de 8 μ l contendo 5 μ l dos produtos de PCR, tampão da *Taq* 1X e 5 unidades de cada enzima de restrição (10 U/ μ l) (New England Biolabs Inc.). O material das reações foi incubado por 2 horas de acordo com a temperatura ideal de cada enzima (Prado et al., 2011a; Hashimoto et al., 2013a).

Para as amplificações multiplex foram utilizados, na mesma reação, tanto os *primers forward* e *reverse* (Tabela 1) como os *primers* espécie-específicos desenvolvidos para as espécies parentais, de acordo com o gene a ser analisado (Tabela 3). As reações foram realizadas em uma concentração de aproximadamente 150 μ M de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X, 0.5 unidades de *Taq polymerase* (Invitrogen), 0.1 a 0.4 μ M de cada *primer* e 10-50 ng de DNA genômico (total de 25 μ l). As amplificações foram realizadas basicamente sob as condições de desnaturação a 95°C por 40s, hibridização de 50 a 58°C (de acordo com o gene analisado) por 40s e extensão a 72°C por 10 a 20s, com 35 repetições (mais detalhes em Prado et al., 2011a e Hashimoto et al., 2013a). As PCRs foram realizadas em termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) e os fragmentos de DNA visualizados em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe™ (Applied Biosystems), utilizando DNA ladder de 1 Kb (Invitrogen).

Tabela 1. Sequências dos *primers* dos genes nucleares e mitocondrial utilizados nas técnicas de PCR-RFLP e PCR-multiplex.

<i>Primer</i>	Sequencia*	Referências
<i>16S F</i>	ACGCCGTTTATCAAAAACAT	Palumbi, 1996
<i>16S R</i>	CCGGTCTGAACTCAGATCCGT	Palumbi, 1996
<u><i>16S PcF</i></u>	TGACGATCCTATCCGGCTAT	Prado et al., 2011a
<u><i>16S PrR</i></u>	TACCTGTTATTGGGTTGTA	Prado et al., 2011a
<i>RAG2 Silu F</i>	CCTGAGTGCTACCTATTCATGGA	Prado et al., 2011a
<i>RAG2 Silu R</i>	CTTGGGAGGAGAGACCATC	Prado et al., 2011a
<u><i>RAG2 PcR</i></u>	AACTCCACCACTCTGAATAAATG	Prado et al., 2011a
<u><i>RAG2 PrR</i></u>	CAGAASC GG GTCTCTGTGGTT	Prado et al., 2011a
<i>EF1α 835 F</i>	ATTGGAACCTTACCTGTGG	Moyer et al., 2004
<i>EF1α 1417 R</i>	CAGCCTTCTGTGCAGACTT	Moyer et al., 2004
<u><i>EF1 PcR</i></u>	CAACAATGCACGCATCTCT	Hashimoto et al., 2013a
<u><i>EF1 PrR</i></u>	ATAAAGACCCAGACAAGATCG	Hashimoto et al., 2013a
<i>NS1 F</i>	GTAGTCATATGCTGTCTC	White et al., 1990
<i>18S Silu R</i>	CCATCGAAAATTGATAGGG	Hashimoto et al., 2013a
<i>Glob Silu F</i>	TCAATATGGTTCATGGACAGA	Hashimoto et al., 2013a
<i>Glob Silu R</i>	CCAGAAGCTGAAAGTAGACAGT	Hashimoto et al., 2013a
<u><i>Glob PcR</i></u>	CAGCCACTTGGGGTTTCCT	Hashimoto et al., 2013a
<u><i>Glob PrF</i></u>	GGTACGTCTATCTCAGTAATTGAAA	Hashimoto et al., 2013a

*Sequência na ordem de 5' para 3', Silu: Siluriformes, F: *Forward*, R: *Reverse*, em negrito os *primers* utilizados no PCR-RFLP, sublinhado os *primers* espécie-específicos adicionados no PCR-multiplex.

Identificação das amostras

Os indivíduos foram inicialmente identificados através dos padrões de banda diagnósticos de cada marcador molecular (Tabela 2). As espécies parentais foram as que apresentaram os marcadores monomórficos espécie-específicos para todos os genes analisados de acordo com a tabela 2. Os híbridos F1 foram os que apresentaram bandas de ambas as espécies, ou heterozigotas, para todos os marcadores nucleares. Os híbridos com marcadores nucleares variáveis entre as espécies ou diferenças entre o marcador mitocondrial e nucleares foram inicialmente categorizados como híbridos avançados, uma vez que podem representar linhagens de híbridos F2, F3 etc. ou retrocruzamentos. O marcador mitocondrial permitiu identificar o parental materno *P. corruscans* ou *P. reticulatum*, categorizar os híbridos F1 como cruzamentos entre fêmea de *P. reticulatum* e macho de *P. corruscans* (F1 PrPc) ou entre fêmea de *P. corruscans* e macho de *P. reticulatum* (F1 PcPr) e a verificar a direção dos cruzamentos avançados.

Tabela 2. Fragmentos diagnósticos dos marcadores nucleares e mitocondrial utilizados na identificação das espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans*.

Técnica	Gene	Fragmento diagnóstico (pb)		Referências	
		Pr	Pc		
PCR-RFLP	DNAn	RAG2	550	300, 250	Prado et al., 2011
		Globina	569	186, 381	Hashimoto et al., 2013a
		EF1	240, 270, 290	240, 560	Hashimoto et al., 2013a
	DNAmt	18S	350	163, 187	Hashimoto et al., 2013a
		16S	300, 350	650	Prado et al, 2011a
PCR-multiplex	DNAn	RAG2	550, 290	550, 330	Prado et al., 2011a
		Globina	569, 137	569, 304	Hashimoto et al., 2013a
	DNAmt	EF1	800, 630	800, 520	Hashimoto et al., 2013a
		16S	650, 400	650, 200	Prado et al., 2011a

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

Também foi utilizado o programa NewHybrids 1.1 (Anderson e Thompson, 2002) para verificar a probabilidade (Q) de cada indivíduo pertencer a uma das seis classes: parental 1 *P. reticulatum* (Pr), parental 2 *P. corruscans* (Pc), primeira geração de híbridos interespecíficos (F1), segunda geração de híbridos (F2), retrocruzamentos de F1 com o parental 1 (R_{PR}) ou retrocruzamentos de F1 com o parental 2 (R_{PC}). Os testes foram baseados em 100.000 varreduras MCMC após um período de *burn-in* de 100.000. Um intervalo de confiança de 90% ($Q \geq 0.90$) foi utilizado para identificar as linhagens parentais, conforme sugerido por estudos simulados (Sanz et al., 2009; Aboim et al., 2010), sendo que os indivíduos com valores de Q entre 0.1 e 0.9 foram classificados como híbridos. Os exemplares que não foram identificados através destes parâmetros, porém, apresentaram genótipos recombinantes visualizados pelos genes nucleares e mitocondrial, foram classificados genericamente como híbridos avançados (H_A).

RESULTADOS

Nas populações dos rios Araguaia (bacia Tocantins-Araguaia), Paraguai, Cuiabá, São Lourenço, Taquari, Negro, Miranda (bacia do Paraguai), Verde, Ivinhema, Paranapanema, Iguaçu, Paraná (população Pr2) (bacia do Paraná) e Uruguai (bacia do Uruguai) foram identificados indivíduos das espécies parentais *P. reticulatum* e/ou *P. corruscans*, sem evidências de híbridos ou introgressão genética (Tabela 3). As espécies destas populações possuíram os marcadores diagnósticos espécie-específicos (Tabela 2) e sua identificação

genética correspondeu à identificação morfológica (Tabela 3). O programa NewHybrids indicou que todos os 458 indivíduos identificados como *P. corruscans* (Tabela 3) apresentaram valores de $Q=0.999$ de pertencerem a esta categoria parental, enquanto os 286 exemplares de *P. reticulatum* (Tabela 3) possuíram $Q=0.990$ de serem esta espécie.

Para estas populações, a visualização em géis de agarose dos marcadores nucleares EF1, RAG2, 18S, e do marcador mitocondrial 16S, permitiu visualizar fragmentos eletroforéticos diagnósticos para as espécies parentais, sem polimorfismos intraespecíficos. O marcador do gene da Globina apresentou-se diagnóstico para a maioria das populações das espécies parentais analisadas. Porém, alguns indivíduos de *P. reticulatum* (N=30) e *P. corruscans* (N=19) apresentaram marcadores não correspondentes entre as técnicas de PCR-RFLP e PCR-multiplex, podendo ser heterozigotos (bandas de ambas as espécies) ou homozigotos, e este marcador não foi utilizado nas análises seguintes.

Em três populações foram observados híbridos na natureza: rio Aquidauana (bacia do Paraguai), rio Paraná (população Pr1) e Mogi-Guaçu (bacia do Paraná) (Tabela 3). As frequências de híbridos foram altas no rio Aquidauana (50 %) e no rio Mogi-Guaçu (44.19 %) enquanto no rio Paraná (Pr1) foi observada uma frequência de 3.92 % de híbridos (Tabela 3). Em relação à identificação morfológica e genética, na população de Pr1, dois indivíduos de *P. corruscans* foram identificados como híbridos. No rio Aquidauana todos os híbridos haviam sido anteriormente categorizados como *P. reticulatum*. Já no rio Mogi-Guaçu, nas amostras de *P. corruscans* foram verificados 2 híbridos, de *P. reticulatum* 3 híbridos e os 15 exemplares identificados como possíveis híbridos realmente pertenciam a esta classe (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de híbridos nas populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans* e sua prévia identificação morfológica.

BH	Pop.	Rio	Época de coleta	N			%H
				Pc	Pr	H	
Ta	Ar (1)	Araguaia	2002-2009	-	24 (24)	-	0.00
Pa	Pa1 (2)	Paraguai	1998-2005	30 (30)	--	--	0.00
	Pa2 (3)	Paraguai	1998-2005	29 (29)	25 (25)	--	0.00
	Pa3 (4)	Paraguai	2002-2005	18 (18)	11 (11)	--	0.00
	Cb1 (5)	Cuiabá	2002-2005	--	08 (08)	--	0.00
	Cb2 (6)	Cuiabá	1998-2005	36 (36)	28 (28)	--	0.00
	Sl (7)	São Lourenço	1998-2005	27 (27)	11 (11)	--	0.00
	Cb3 (8)	Cuiabá	2002-2010	16 (16)	42 (42)	--	0.00
	Ta1 (9)	Taquari	1998-2005	29 (29)	16 (16)	--	0.00
	Ta2 (10)	Taquari	1998-2005	28 (28)	--	--	0.00
	Ng (11)	Negro	1998-2005	34 (34)	23 (23)	--	0.00
	Aq (12)	Aquidauana	1998-2005	-	15 (30)	15 (0)	50.00
	Mir (13)	Miranda	1998-2005	12 (12)	40 (40)	--	0.00
	Pr1 (14)	Paraná/Jupia	2009	49 (51)	--	02 (00)	3.92
Ve (15)	Verde	2008-2011	43 (43)	-	-	0.00	
Mogi (16)	Mogi-Guaçu	2008-2011	12 (14)	12 (14)	19 (15)	44.19	
Pr	Ivinhema	2004	19 (19)	-	-	0.00	
Pp (18)	Paranapanema	2003	30 (30)	4 (4)	-	0.00	
Ig (19)	Iguaçu	1998-2005	5 (5)	14 (14)	-	0.00	
Pr2 (20)	Paraná	2011	35 (35)	14 (14)	-	0.00	
Ur	Ur (21)	Uruguai	2003	6 (6)	-	-	0.00
Total				458 (462)	286 (304)	36 (15)	-

BH: Bacias hidrográficas (Ta: Tocantins/Araguaia, Pa: Paraguai, Pr: Paraná, Ur: Uruguai), Pop: população (os números em parênteses indicam as respectivas localidades na Figura 1), N: número amostral, Pc: *P. corruscans*, Pr: *P. reticulatum*, H: híbridos. Entre parênteses está indicada a prévia identificação morfológica dos exemplares.

A classificação dos híbridos através do programa NewHybrids indicou $Q=0.696$ de chance dos híbridos F1 pertencerem a esta classe híbrida. Em genótipos com maior mistura, alguns exemplares foram classificados como R_{PR} (retrocruzamentos entre F1 e *P. reticulatum*), apresentando Q entre 0.506 e 0.954 (Tabela 4). Dez híbridos foram classificados como espécies parentais (indivíduos 4, 6, 8, 10, 11, 14 - Aq; 1, 2, 16, 19 - Mogi), porém, com $Q \leq 0.871$ de serem puros, os quais foram posteriormente categorizados como híbridos avançados por não ser possível sua distinção entre as classes híbridas. Um exemplar (1-Mogi), apesar de possuir todos os marcadores nucleares de *P. corruscans* ($Q=0.999$), apresentou o

marcador mitocondrial de *P. reticulatum* o que indica que é um híbrido avançado (Tabela 4). Outro indivíduo (19-Mogi) possuiu metade de chance de ser um híbrido F2 e metade de ser um R_{PR}, também classificado genericamente como híbrido avançado (Tabela 4).

Desta forma, foi possível verificar um total de 13 híbridos avançados na população de Aq, dos quais sete possivelmente resultam de retrocruzamentos entre F1 e *P. reticulatum* (R_{PR}). Também foram observados dois híbridos F1 nesta localidade. Na população de Pr1 foram observados dois híbridos F1 (Tabela 4). O marcador mitocondrial demonstrou que todos estes peixes possuíram herança materna de *P. reticulatum* (Tabela 4). No rio Mogi-Guaçu foram encontrados sete híbridos F1 e 12 híbridos avançados, dos quais oito foram do tipo R_{PR}. Entre os F1, cinco possuíram o marcador mitocondrial de *P. reticulatum* e dois de *P. corruscans*(Tabela 4). Os híbridos R_{PR} possuíram o DNA mitocondrial de *P. reticulatum* e as outras linhagens avançadas demonstraram este marcador de ambas as espécies (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação dos indivíduos híbridos de acordo com seu genótipo nuclear e mitocondrial e sua probabilidade de classificação.

Pop.	Fen.	RAG2		EF1		18S		NewHybrids (Q)	DNAm _t		Classe
		Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr		Pc	Pr	
Aq	1 (Pr)	-	x	-	x	x	x	0.506 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	2(Pr)	-	x	-	x	x	x	0.506(R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	3 (Pr)	x	x	-	x	x	x	0.932 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	4 (Pr)	x	x	-	x	-	x	0.643 (Pr)	-	x	H _A
	5 (Pr)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
	6 (Pr)	x	x	-	x	-	x	0.643 (Pr)	-	x	H _A
	7 (Pr)	-	x	x	x	-	x	0.670 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	8 (Pr)	x	x	-	x	-	x	0.643 (Pr)	-	x	H _A
	9 (Pr)	-	x	-	x	x	x	0.670 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	10 (Pr)	x	x	-	x	-	x	0.643 (Pr)	-	x	H _A
	11 (Pr)	x	x	-	x	-	x	0.643 (Pr)	-	x	H _A
	12 (Pr)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
	13 (Pr)	x	x	-	x	x	x	0.932 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	14 (Pr)	x	x	-	x	-	x	0.643 (Pr)	-	x	H _A
	15 (Pr)	x	x	-	x	x	x	0.932 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
Pr1	1(Pc)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
	2(Pc)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
Mogi	1 (Pc)	x	-	x	-	x	-	0.999 (Pc)	-	x	H _A
	2 (Pc)	x	-	x	x	x	-	0.871 (Pc)	x	-	H _A
	3 (Pr)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
	4 (Pr)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	x	-	F1 (PcPr)
	5 (Pr)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	x	-	F1 (PcPr)
	6 (H)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
	7 (H)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
	8 (H)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1 (PrPc)
	9 (H)	x	x	x	x	x	x	0.696 (F1)	-	x	F1
	10 (H)	x	x	x	x	-	x	0.941 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	11 (H)	x	x	x	x	-	x	0.941 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	12 (H)	x	x	-	x	x	x	0.932 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	13 (H)	x	x	-	x	x	x	0.932 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	14 (H)	-	x	-	x	x	x	0.506 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	15 (H)	-	x	-	x	x	x	0.506 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	16 (H)	x	x	-	x	-	x	0.643 (Pr)	-	x	H _A
	17 (H)	-	x	x	x	-	x	0.670 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	18 (H)	-	x	x	x	-	x	0.670 (R _{PR})	-	x	H _A (R _{PR})
	19 (H)	-	x	x	x	x	-	0.500 (R _{PR}), 0.500 (F2)	x	-	H _A

Pop: população, Fen.: fenótipo, DNAm_t: DNA mitocondrial, Pc – *P. corruscans*, Pr – *P. reticulatum*, H: híbrido, PrPc: cruzamento entre fêmea de *P. reticulatum* e macho de *P. corruscans*, PcPr: cruzamento entre fêmea de *P. corruscans* e macho de *P. reticulatum*, H_A: híbrido avançado, R_{PR}: retrocruzamento de F1 com *P. reticulatum*.

DISCUSSÃO

Marcadores genético moleculares

Os marcadores genético moleculares dos genes nucleares e mitocondriais utilizados neste estudo demonstraram um padrão molecular único entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*, sem a ocorrência de variações intraespecíficas para os marcadores RAG2, EF1, 18S e 16S. Apesar das metodologias de PCR-multiplex e PCR-RFLP utilizadas terem base em polimorfismos de poucos nucleotídeos, estes marcadores consistem em fragmentos de genes com diferenças fixas em sua composição nucleotídica entre *P. reticulatum* e *P. corruscans* (Prado et al., 2011a; Hashimoto et al., 2013a). Os resultados obtidos para as populações analisadas neste estudo comprovam o conservadorismo e especificidade destas regiões gênicas, mesmo em amostras provenientes de localidades distantes geograficamente, como entre os rios Araguaia, rios da Bacia do Paraguai, Paraná e Uruguai, confirmando a eficiência destes genes na identificação destas espécies e seus híbridos (Prado et al., 2011a; Prado et al., 2012a; Hashimoto et al., 2013a). O marcador do gene Globina, apesar de ser diagnóstico e útil na identificação da maioria dos indivíduos, apresentou polimorfismos que possivelmente estão relacionados com a amplificação de outras regiões gênicas, uma vez que a Globina faz parte de uma família multigênica (Tomoko, 1983; Goodman et al., 1988). Apesar disto, este marcador pode ser útil para auxiliar em outros estudos que envolvam a diferenciação entre estas espécies.

Híbridos interespecíficos diplóides em peixes comumente podem ser identificados por possuírem fragmentos eletroforéticos heterozigotos de ambas espécies parentais, com ocorrência de uma herança mendeliana clássica (Ostberg et al., 2004; Hashimoto et al., 2011a; Porto-Foresti et al., 2013; Cunha et al., 2013), o que foi confirmado neste estudo. Em relação aos híbridos avançados, após a primeira geração híbrida, é difícil discriminar quando um indivíduo é um híbrido recente (F1) ou um membro de uma das duas populações parentais submetidos à introgressão avançada (Rhymer e Simberloff, 1996; Allendorf et al., 2001). Isso se deve ao alto número de combinações genéticas resultantes do inter cruzamento de híbridos F1 entre si ou o retrocruzamento destes híbridos com as espécies parentais, resultando, por exemplo, em animais com genótipos homozigotos como seus parentais ou heterozigotos como um híbrido F1 (Toledo-Filho et al., 1994; Scribner et al., 2001).

A utilização de um marcador nuclear diagnóstico para verificar hibridação em populações selvagens pode ser eficaz quando a hibridação começou apenas recentemente e a taxa de introgressão é baixa (Vähä e Primmer, 2006). Testes utilizando diferentes números de marcadores nucleares demonstraram que a sua eficácia em distinguir os *taxa* está diretamente relacionada com a diferenciação dos *loci* entre as espécies parentais (Roques et al., 1999; Vähä e Primmer, 2006; Sanz et al., 2009; Bohling et al., 2013), ou seja, quando os marcadores são variáveis dentro da espécie, e possuem pouca diferenciação interespecífica, um maior número de marcadores é requerido nas análises (Vähä e Primmer, 2006). Em casos de marcadores altamente diagnósticos, como os genes utilizados no presente trabalho, três genes nucleares demonstraram ser eficazes para detectar mesmo a hibridação introgressiva, como verificado em outros estudos que utilizaram de dois a quatro marcadores nucleares (Rubidge et al., 2001; Rubidge e Taylor, 2004; Lammer et al., 2010; Devitt et al., 2011).

Análises bayesianas, como as utilizadas no programa NewHybrids, que indiquem a probabilidade dos indivíduos pertencerem a determinada categoria, são importantes para distinguir os híbridos entre suas classes F1 ou avançadas e determinar com maior precisão a introgressão genética nas populações (Anderson e Thompson, 2002). No entanto, como observado por estes autores, a correspondência entre a classe de frequência do genótipo e a classe genealógica (parentais, F1, F2 ou retrocruzamentos) aplica-se apenas às duas primeiras gerações de cruzamentos, enquanto gerações mais avançadas tornam-se indistinguíveis ou com menor probabilidade de identificação. Apesar de suas limitações, este método é um dos mais eficazes para a detecção de híbridos e introgressão (Sanz et al. 2009). Aboim et al. (2010) demonstraram uma menor probabilidade de classificação de alguns híbridos avançados através do programa NewHybrids, devido à sua alta heterogeneidade alélica, com valores de Q menores que 0.533, por exemplo, indicando mistura genética. Já Devitt et al. (2011) utilizaram um parâmetro de Q entre 0.1 a 0.9 para identificar que os indivíduos eram híbridos, independente de sua classificação posterior. *Loci* nucleares adicionais possivelmente permitiriam maior acuracidade na porcentagem de classificação dos híbridos analisados neste trabalho, entretanto, os três marcadores utilizados foram suficientes para documentar a existência de híbridos e introgressão na natureza, incluindo a presença de genótipos recombinantes que somente podem ter surgido através de cruzamentos avançados.

O DNAmitocondrial, apesar de não ser um marcador diagnóstico para detectar hibridação, pode ser uma ferramenta eficaz para auxiliar na identificação de espécies, híbridos recíprocos e na direção de eventos de hibridação em ambientes selvagens (Gunnel et al.,

2008; Metcalf et al., 2008; Broughton et al., 2011). Neste trabalho o DNA mitocondrial permitiu discriminar os híbridos recíprocos F1 através da observação do seu parental materno (*P. reticulatum* ou *P. corruscans*) e também indicou que os retrocruzamentos na natureza envolvem a espécie *P. reticulatum*. Também foi interessante verificar que esta região genômica possibilitou identificar um híbrido avançado, que apresentou todos os marcadores nucleares de *P. corruscans* e o marcador mitocondrial de *P. reticulatum*. Este genótipo provavelmente resulta de retrocruzamentos entre o híbrido *PrPc* com *P. corruscans*, seguido de retrocruzamentos sucessivos com a espécie parental *P. corruscans*. Fato similar foi observado por Bettles et al. (2005) estudando hibridação em trutas, onde observou indivíduos homocigotos para uma espécie em sete marcadores nucleares mas apresentando o DNA mitocondrial da espécie oposta. Este indivíduo foi classificado pelos autores como um híbrido "antigo", resultante de alta introgressão entre as espécies.

Ocorrência de híbridos e introgressão genética na natureza

Neste trabalho, os resultados da identificação genética das populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans* indicam que não ocorreram híbridos na maioria das localidades, mesmo em locais onde as espécies ocorrem em simpatria, como em alguns rios da bacia do Paraguai e Paraná (Lundberg e Littman, 2003; Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Estudos relatam algumas diferenças de crescimento e tamanho do corpo durante os estágios de maturação sexual entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* (Resende et al., 1996). Além disso, apesar destas espécies migrarem durante o mesmo período, podem ocorrer diferenças na duração total do período reprodutivo (Resende et al., 1996; Godinho, 2007). Mesmo em locais onde estas espécies ocorrem em simpatria, estes mecanismos podem dificultar a formação de zonas híbridas naturais. Não obstante, a presença das mesmas diferenças genéticas fixas entre estas espécies em regiões de simpatria, assim como em outras localidades de sua distribuição, indicam que qualquer introgressão natural tem sido rara.

Por outro lado, os dados aqui obtidos confirmam a ocorrência de híbridos destas espécies nos rios Paraná (população Pr1), Aquidauana e Mogi-Guaçu, que correspondem às mesmas localidades onde foram observados híbridos anteriormente (Prado et al., 2012a). O presente estudo, além de ter analisado uma maior quantidade de indivíduos e rios de ocorrência das espécies, também demonstrou uma alta introgressão genética nas populações de Aquidauana e Mogi-Guaçu, o que ainda não havia sido descrito para populações naturais

de *P. corruscans* e *P. reticulatum*. Nestes locais, aproximadamente metade dos indivíduos coletados corresponderam a híbridos, em sua maior parte retrocruzamentos, demonstrando que nestas populações existem indivíduos resultantes de uma mistura genética entre as espécies.

Escapes de peixes de cultivo tem sido relatados em todo o mundo, responsável pela introdução de espécies exóticas que hibridam com espécies nativas, em muitos casos levando à introgressão genética (Scribner et al., 2001), como observado principalmente em espécies de interesse comercial como salmão e truta (Allendorf e Leary, 1988; Allendorf et al., 2004; Glover et al., 2012; Zhang et al., 2013). A hipótese mais aceita para a presença de híbridos em populações de *P. corruscans* e *P. reticulatum* são escapes e introduções dos próprios híbridos produzidos em cultivo (Bignotto et al., 2009; Porto-Foresti et al., 2010; Prado et al., 2012a). Como estes animais tem sido extensivamente produzidos em pisciculturas nacionais e os produtores tem dificuldades em identificar visualmente os exemplares (Hashimoto et al., 2013), possivelmente estes peixes estejam escapando ou sendo acidentalmente introduzidos na natureza. Isto é evidente em locais com frequências muito altas de híbridos (rios Mogi-Guaçu e Aquidauana), onde existem diversas pisciculturas produtoras de alevinos (Suplicy, 2007).

O escape de peixes para o ecossistema aquático é um fato alarmante observado na maioria das pisciculturas brasileiras (cerca de 95% de acordo com Castellani e Barrela, 2005) principalmente devido ao alagamento dos tanques de criação e a introdução acidental de peixes em rios (Orsi e Agostinho, 1999; Fernandes et al., 2003; Castellani e Barrella, 2005). Mesmo os projetos de reintrodução de espécies nativas, caso não sejam acompanhados por uma identificação genética e um manejo efetivo dos produtos, podem ser responsáveis pela liberação de peixes no ambiente selvagem.

As espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* são peixes de grande porte (Resende et al., 1996; Mateus e Penha, 2007) e seus híbridos produzidos em cultivo também atingem mais de um metro de comprimento (José A. Senhorini, comunicação pessoal). Como os escapes e introduções de peixes podem ser mais frequentes para alevinos ou juvenis, por serem pequenos e de difícil controle (Fernandes et al., 2003), os híbridos adultos identificados neste estudo e coletados na natureza são uma evidência de que estes animais aparentemente tem um desenvolvimento normal, são viáveis e estão permanecendo nos rios.

Uma vez que tenham sido detectados híbridos na natureza, a introgressão genética observada neste estudo pode ter duas origens. A primeira seria o escape ou introduções de

híbridos F1 que posteriormente estariam se reproduzindo com as espécies parentais, gerando os híbridos avançados e retrocruzamentos nos rios. Outra fonte de introgressão genética pode ser o cultivo, e os híbridos avançados produzidos em pisciculturas nacionais (Hashimoto et al., 2013a) também podem estar entrando em contato com os rios.

Analisando-se individualmente as localidades com híbridos observadas neste estudo foi possível verificar que os híbridos no rio Paraná foram do tipo F1 e ocorreram em baixa quantidade. Como este ponto de coleta se localizou à jusante da represa de Jupuíá, peixes de diversas regiões próximas da bacia do Alto Paraná, incluindo os híbridos, podem ter migrado para esta região do rio. Já em Aquidauana, como a maior parte da população foi composta por retrocruzamentos com *P. reticulatum* e uma baixa quantidade de F1, é possível que tenha ocorrido um contato de híbridos com esta população a algumas gerações passadas, ocasionando a introgressão de genes.

O rio Mogi-Guaçu é um importante exemplo de alterações ambientais relacionadas com a alteração antrópica dos sistemas aquáticos. *P. corruscans* foi introduzido neste rio e desde então foi relatada como a única espécie do gênero a ocorrer na ictiofauna local (Meschiatti e Arcifa, 2007). Contudo, os dados do presente trabalho indicam a ocorrência de *P. reticulatum* no rio a partir de 2008, que possivelmente foi introduzida. Além disso, a extensa quantidade de ambos os híbridos recíprocos F1 e retrocruzamentos demonstra que provavelmente ocorre uma constante contaminação deste rio por escapes ou introduções de pisciculturas, levando à hibridação generalizada na natureza. O rio Mogi-Guaçu é atualmente um ambiente "fechado" para os grandes migradores, limitado pelo reservatório da PCH (pequena central hidrelétrica) de Emas até o rio Grande, onde existem as barragens de Marimondo e Volta Grande que impedem a movimentação dos peixes migradores para outros rios (José A. Senhorini, comunicação pessoal). *P. corruscans* permanece durante seis a oito meses no rio Grande, e migra para o rio Mogi-Guaçu para se reproduzir (José A. Senhorini, comunicação pessoal). As espécies e híbridos ali introduzidos representam grande impacto, pelos riscos ecológicos e genéticos que os híbridos representam (Toledo-Filho et al., 1004; 1998; Allendorf et al., 2010). Este ambiente, apesar de não ser de ocorrência natural destas espécies, pode ser um interessante modelo ambiental e evolutivo para ser utilizado para futuros estudos sobre as consequências da ocorrência destes híbridos na natureza, tais como o futuro estabelecimento ou não das linhagens híbridas, a extensão da introgressão e a possível extinção genética de *P. corruscans* nesta localidade.

Implicações para a conservação

As espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* apresentam alta divergência genética e, apesar das controvérsias que envolvam os conceitos de espécie, encontram-se diferenciadas geneticamente a aproximadamente 11.8 a 10 milhões de anos atrás, quando *P. corruscans* se separou do grupo que posteriormente daria origem a *P. reticulatum* (Torrico et al., 2009). Em casos de introgressão genética, como o verificado neste trabalho, a extinção de alelos únicos das espécies parentais e a possível perda de adaptações de populações locais estabelecidas durante sua história evolutiva pode ser irreversível (Allendorf et al., 2010).

Pode ocorrer a “diluição” dos genomas parentais e a decorrente extinção genética, ou seja, as espécies geneticamente distintas deixam de existir e dão lugar a uma população composta apenas por híbridos (Huxel, 1999; Epifanio e Philipp, 2001; Muhlfeld et al., 2009; Allendorf et al., 2010). Estas populações hibridizadas podem se fundir em uma única unidade, reduzindo a diversidade taxonômica (uma espécie ao invés de duas); ou em caso de isolamento de uma população híbrida pode ser produzido um taxon inteiramente novo, aumentando a diversidade taxonômica (duas espécies parentais e a espécie "híbrida"). Por outro lado, em populações com hibridação introgressiva pode ocorrer depressão exogâmica, ou seja, a redução da aptidão de híbridos F1 ou F2, que resulta de incompatibilidades genéticas ou baixa adaptação às condições ambientais locais (Allendorf et al., 2010). Desta forma, mesmo se ocorrer a formação de uma população composta por híbridos, a questão é se estes irão se adaptar ou todo o *pool* gênico das espécies hibridizadas será perdido.

Como ações de gestão, alguns pesquisadores indicam a retirada dos híbridos do ambiente na tentativa de minimizar os danos genéticos para as espécies nativas e impedir a introgressão generalizada (Allendorf et al., 2001; 2010). De acordo com os autores, esta medida é válida em locais onde a introgressão não é alta, como no rio Paraná analisado neste trabalho. Em locais onde a população é constituída por mistura genética, como rio Aquidauana e Mogi-Guaçu, além de ser muito difícil identificar quais são as espécies parentais após uma introgressão avançada, seria necessário avaliar se população é passível de proteção, uma vez que possuiu alelos únicos destas populações locais (Allendorf et al., 2001; 2010). Um importante fator para este tipo de medida é considerar quantas populações não hibridizadas da espécie ainda restam, ou seja, quanto menos populações puras, maior o valor da conservação de qualquer população hibridizada (Allendorf et al., 2004). Os híbridos podem

representar um conjunto genético distinto a ser conservado, além da possibilidade de preencher o papel ecológico da espécie parental (Allendorf et al., 2004).

No caso de Salmonídeos, a introgressão generalizada entre espécies nativas e não nativas tem criado populações híbridas em extensas áreas geográficas extensas, resultando em extinção genômica (Muhlfeld et al., 2010). Estes autores indicam que mesmo pequenas quantidades de hibridização reduzem acentuadamente a aptidão de trutas machos e fêmeas, e o sucesso reprodutivo declinou em cerca de 50 %, com apenas 20 % de mistura genética, sugerindo que os estudos que sugerem conservar populações hibridizadas devem ser revistos.

Outro ponto importante a ser considerado nas ações de conservação de *P. corruscans* e *P. reticulatum* é a migração que realizam durante seu período reprodutivo (Carolsfeld et al., 2003; Resende, 2003; Godinho et al., 2007). Apesar de ser difícil prever o comportamento biológico dos híbridos, caso realizem migrações sazonais, estes animais podem se deslocar para outros rios e se reproduzir, ocasionando uma maior disseminação da introgressão genética entre as espécies.

Políticas que normatizem, regularizem e fiscalizem a produção de híbridos em pisciculturas do Brasil possivelmente são a melhor opção para a conservação destas espécies, a fim de evitar novos escapes e introduções de espécies na natureza. Porém, as leis devem ser flexíveis, levando em consideração aspectos ambientais e sociais, uma vez que existem diferentes cenários e situações. Com o intuito de alertar os produtores de peixes a respeito dos riscos ambientais e os problemas comerciais (mortalidade, problemas de desenvolvimento e heterogeneidade morfológica) que podem ocorrer pela produção acidental de híbridos F2 ou retrocruzamentos (Toledo-Filho et al., 1994; 1998; Porto-Foresti et al., 2010), alguns trabalhos de divulgação científica (Hashimoto et al., 2011b; Porto-Foresti et al., 2011; Prado et al., 2011b) foram publicados no Brasil.

Uma contínua análise genética também é essencial para verificar a amplitude da introgressão genética nas populações naturais (Toledo-Filho et al., 1994; 1998; Allendorf et al., 2001; 2004; 2010). Os dados do presente estudo podem ser úteis para futuros monitoramentos temporais da hibridação nos rios de ocorrência das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum*. Estudos ecológicos e sobre a viabilidade de suas gerações híbridas, assim como seus níveis de fertilidade e migração também consistem etapas essenciais a serem adicionadas às análises genéticas. Como estas espécies estão distribuídas por diversos rios e bacias hidrográficas, provavelmente ainda possam ser realizadas medidas de manejo dos híbridos da natureza.

CAPÍTULO 2

Diversidade e estruturação genética em populações dos peixes migradores Neotropicais *Pseudoplatystoma reticulatum* e *P. corruscans* em rios das bacias do Paraguai e Paraná.

RESUMO

O conhecimento de como a variação genética é dividida dentro e entre as populações pode ter implicações importantes na biologia evolutiva e conservação das espécies. Estimativas confiáveis de diferenciação população são cruciais para entender a conectividade entre as populações e representam ferramentas importantes para o desenvolvimento de estratégias de conservação. Neste trabalho foi analisada a diversidade genética intra e interpopulacional dos bagres *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma corruscans* provenientes de rios distribuídos pelas bacias do Paraguai, Alto e Baixo Paraná (Bacia Platina, América do Sul) utilizando microssatélites. Os resultados evidenciaram uma alta diversidade em todas as localidades estudadas para ambas as espécies. Foi verificada ausência de diferenciação e alta similaridade genética entre rios da bacia do Paraguai nas amostras de *P. reticulatum* e *P. corruscans*, indicando a possível existência de uma população panmítica e homogeneização genética resultante da migração e reprodução entre rios próximos. Em *P. reticulatum*, uma diferenciação baixa a moderada, porém significativa, foi verificada entre rios mais distantes geograficamente como Cuiabá e Miranda, e entre a bacia do Paraguai e Baixo Paraná. Em *P. corruscans* as análises de estruturação genética revelaram dois grupos distintos, compostos pelos rios Cuiabá (Bacia do Paraguai) e Verde+Paranapanema (Bacia do Alto Paraná). Não foi observada diferenciação entre os rios da bacia do Paraguai e Baixo Paraná. Porém, uma diferenciação moderada foi encontrada entre os rios do Paraguai+Baixo Paraná e os rios do Alto Paraná, o que pode ser devido à distância geográfica e o isolamento entre estes locais pela usina de Itaipú. Os diferentes cenários de diferenciação populacional entre estas espécies podem estar relacionados à distintos comportamentos migratórios. Este trabalho disponibiliza informações sobre a diversidade e estruturação genética destes peixes, que contribuem para o conhecimento genético de suas populações naturais e podem ser úteis em futuras ações de conservação e manejo. Além disso, estes dados genéticos podem complementar análises ecológicas sobre a migração destas espécies.

INTRODUÇÃO

A presença de variação genética é essencial para o potencial de sobrevivência das espécies e para a evolução com sucesso em resposta a mudanças ambientais (Laikre et al., 1999). Porém, tem sido crescente o número de espécies que se encontram ameaçadas pela diminuição da variação genética de suas populações, decorrente principalmente da sobre-exploração de recursos naturais, poluição e introdução de espécies não nativas (Frankham e Briscoe, 2002). Os fragmentos de populações de baixa abundância podem tornar-se cada vez mais vulneráveis a características correlacionadas com o risco de extinção, incluindo a perda de variação genética através de deriva genética, o acúmulo de mutações ligeiramente deletérias, depressão por endogamia, e a incapacidade de se adaptar às mudanças (Laikre et al., 1999; Frankham e Briscoe, 2002; Templeton, 2011).

Uma população é definida como um conjunto de indivíduos intercruzantes da mesma espécie, que vive em proximidade de forma a manter o sistema de acasalamento em comum (Templeton, 2011). Associada com cada população local está uma população correspondente de genes locais chamada de *pool* gênico, o conjunto de genes coletivamente compartilhados pelos indivíduos de uma população (Templeton, 2011). Conservar espécies, portanto, não é o suficiente; o seu potencial evolutivo, representado pela variabilidade genética intra e interpopulacional também precisa ser conservado (Frankham e Briscoe, 2002; Frankham et al., 2008). A verificação da estruturação genética de populações naturais possibilita esclarecer que forma a variabilidade genética está distribuída ao longo da ocorrência geográfica da espécie, verificar o que é necessário conservar, como deve ser feito um manejo correto das populações que estejam ameaçadas e como monitorar a diversidade biológica (Laikre et al., 1999).

Os peixes *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim “pintado”) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (surubim “cachara”) são bagres pertencentes à família Pimelodidae, na qual está incluída grande parte dos Siluriformes da região Neotropical, com mais de noventa espécies descritas (Lundberg e Littmann, 2003; Ferraris et al., 2007; Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Representam um importante papel ecológico por serem grandes predadores e desta forma, exercerem forte pressão sobre os níveis inferiores da cadeia trófica aquática (Resende et al., 1996). Sua distribuição é endêmica do continente Sul Americano, com ampla ocorrência em rios de importantes bacias hidrográficas. Ocorrem em simpatria na bacia do Prata, que inclui as bacias dos rios Paraguai, Paraná e Uruguai (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai)

(Lundberg e Littman, 2003; Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Em outras localidades ocorre apenas uma das espécies, como *P. corruscans* na bacia do rio São Francisco e *P. reticulatum* na bacia Amazônica (Lundberg e Littman, 2003; Buitrago-Suárez e Burr, 2007).

Estas espécies apresentam hábitos migratórios e realizam movimentos laterais complexos entre rios, lagos e várzeas de rios, assim como movimentos longitudinais ao longo dos canais fluviais (Carolsfeld et al., 2003; Godinho et al., 2007). As migrações para reprodução são anuais, com início no período chuvoso onde nadam para as cabeceiras dos rios para se reproduzir, usualmente durante os meses de outubro a janeiro (Resende, 2003; Godinho et al., 2007). Assim como outros bagres, realizam dois fluxos migratórios principais durante o ano: inicialmente permanecem nos leitos dos rios durante janeiro a setembro (época de alimentação), em outubro iniciam a migração rio acima (época de reprodução) e posteriormente os adultos migram rio abaixo para se alimentar no rio principal, enquanto os juvenis permanecem por algum tempo nos lagos (Resende, 2003; Godinho et al., 2007). Também foi evidenciado que possivelmente esta espécie apresenta o comportamento de “*homing*”, ou seja, retorne sempre ao seu local de nascimento para se reproduzir (Pereira et al., 2009). Contudo, ainda há pouco conhecimento sobre o comportamento migratório destas espécies, como as distâncias que percorrem e os movimentos da história de vida e de desova de adultos, especialmente para *P. reticulatum*.

Além de sua importância biológica, estes bagres estão entre as principais espécies nativas produzidas no Brasil (Crepaldi et al., 2006; Campos, 2010; Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010). Entretanto, a pesca excessiva, a poluição dos ambientes aquáticos e as construções de barragens que dificultam ou impedem sua migração representam um fator crucial na diminuição de suas populações selvagens (Carolsfeld et al., 2003; Bignotto et al., 2009; Mello et al., 2009). *P. corruscans* foi recentemente incluído na lista de espécies criticamente em perigo (Mello et al., 2009).

A genética é uma importante ferramenta para o estudo da biodiversidade e para o manejo e conservação de populações selvagens que sofrem impactos antrópicos (Hansen et al., 2001; Schwartz et al., 2007; Allendorf et al., 2010; Zhang et al., 2013). Marcadores altamente polimórficos, como os microssatélites, são regiões abundantes no genoma nuclear que se caracterizam por terem motivos de sequência curta (2 a 6 pares de bases) que se repetem em *tandem* diversas vezes (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Estas regiões do DNA seguem modelos evolutivos simples (marcadores neutros), são facilmente genotipados através de PCR (*polymerase chain reaction*), têm sido amplamente desenvolvidos para diferentes

espécies e utilizados para acessar a diversidade genética e detectar estruturação populacional (Oliveira et al., 2009; Ciofi et al., 2011; Vera et al., 2011; Vargas-Ramirez et al., 2012; Storfer et al., 2013). Assim, este trabalho buscou utilizar microssatélites para avaliar a diversidade genética intrapopulacional e estruturação genética entre populações das espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans* em diversas localidades da bacia do Prata, América do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas amostras de nadadeiras de populações provenientes de rios das bacias do Paraguai e Paraná (bacia Platina, América do Sul). As amostras de *Pseudoplatystoma reticulatum* totalizaram 119 indivíduos adultos provenientes de seis populações: rios Paraguai, Cuiabá, Taquari, Negro, Miranda (Bacia do Paraguai) e Paraná (Bacia do Baixo Paraná). As amostras de *P. corruscans* compuseram um total de 202 exemplares adultos provenientes de sete populações: rios Paraguai, Cuiabá, Taquari, Negro, (Bacia do Paraguai), Verde, Paranapanema (Bacia do Alto Paraná) e Paraná (Bacia do Baixo Paraná) (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1. Locais de coleta, época de coleta e número de amostras de *P. corruscans*, *P. reticulatum*.

BH	Rio	Pop	Época de coleta		N	
			Ano	Mês	Pc	Pr
Pa	Cuiabá	Cb	1998-2005	Outubro a janeiro (R)	33	27
	Paraguai	Pa	1998-2005	(N)	24	22
	Taquari	Ta	1998-2005	Outubro a janeiro (R)	22	12
	Negro	Ng	1998-2005	Outubro a janeiro (R)	32	20
	Miranda	Mir	1998-2005	(N)	-	28
APr	Verde	Ve	2008-2011	Outubro a novembro (R)	30	-
	Paranapanema	Pp	2003	Outubro a janeiro (R)	30	-
BPr	Paraná	Pr	2011	Setembro a outubro (A/R)	31	10
Total					202	119

BH: Bacia hidrográfica, Pa: Paraguai; APr: Alto Paraná, BPr: Baixo Paraná, Pop: população, N: número amostral, Pc: *P. corruscans*, Pr: *P. reticulatum*; R: época de reprodução, A: época de alimentação, N: dados não disponíveis.

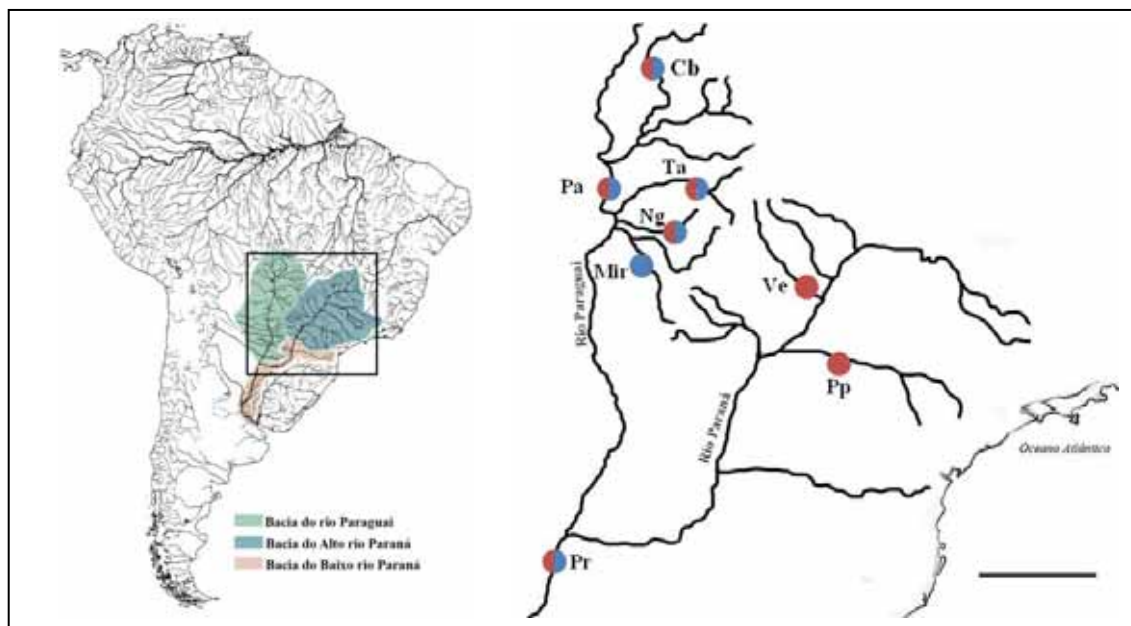


Figura 1. Locais de coleta identificados por círculos coloridos que representam onde foram amostradas as espécies *P. reticulatum* (azul) e *P. corruscans* (vermelho). Os rios correspondentes às siglas e a quantidade de indivíduos estão indicados na Tabela 1. Barra = 300 Km.

A extração e purificação do DNA genômico total foi realizada de acordo com o protocolo descrito no kit comercial Wizard genomic DNA purification kit (Promega). Todos os exemplares foram genotipados utilizando dez *loci* microssatélites previamente desenvolvidos para *P. reticulatum* e testados em *P. corruscans* (Prado et al., *in press*).

As amplificações foram realizadas através de dois PCR-multiplex, utilizando grupos de 5 *primers* por PCR, sendo os *primers forward* marcados com fluorescência. No multiplex 1 foram adicionados os *primers forward* Prt3^{NED}, Prt11^{6-FAM}, Prt12^{Pet}, Prt25^{Pet} e Prt34^{6-FAM}; e multiplex 2: *primers forward* Prt5^{Pet}, Prt27^{VIC}, Prt30^{6-FAM}, Prt36^{NED} e Prt39^{6-FAM}) (NED - amarelo, VIC - verde, Pet - vermelho ou 6-FAM - azul) (Applied Biosystems). As reações tiveram um volume final de 10 µl contendo 5 µl de Mix para PCR (Quiagen Master mix - 100 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, tampão da *Taq* 1X, 0.5 unidades de *Taq polymerase*), 0.4 µM de cada *primer* e 30 ng de DNA genômico. O programa consistiu em 15 min a 95°C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final de 60 °C por 30 min em um termociclador VeritiTM (Applied Biosystems).

Os produtos de PCR foram confirmados em gel de agarose a 1% agarose utilizando o DNA ladder de 100 pares de bases (pb) DNA ladder (Invitrogen) corado com SYBR SafeTM (Applied Biosystems) e posteriormente aplicados em analisador genético automático ABI

PRISM_3730 (Applied Biosystems). O tamanho dos alelos foram estabelecidos e marcados utilizando o programa Gene Mapper 3.7 (Applied Biosystems).

Análises estatísticas e programas

Os microssatélites foram utilizados para estimar os valores de diversidade genética intra e interpopulacional de *P. reticulatum* e *P. corruscans*. Os microssatélites Prt11 e Prt34 foram excluídos das análises em *P. corruscans*, pois estavam marcados com a mesma fluorescência (6-FAM – azul) e durante a análise dos genótipos seus alelos apresentaram tamanhos muito próximos, não sendo possível distingui-los entre os *loci*.

Para cada espécie foram estabelecidos os valores alélicos totais e médios por *locus* e por população. O número de indivíduos analisados, número de alelos e valores de heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram obtidos através do programa Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998). Riqueza alélica foi obtida através do programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Os valores de Fis (coeficiente de endogamia) e os cálculos de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e desequilíbrio de ligação foram analisados através de testes exatos de Fisher, implementados no programa GenePop 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Para verificar a ocorrência de alelos nulos utilizou-se o programa Micro-checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Os valores de significância ($P < 0.05$) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Para investigar a ocorrência de estruturação genética entre as populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans* foram obtidos os índices de F_{st} (Weir e Cockerham, 1984) assumindo o modelo de alelos infinitos (IAM) para todos os *loci* e para todos os pares de populações no programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005). Neste mesmo programa foram realizados testes de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) para verificar a distribuição da variação entre populações, grupos de populações e dentro de populações. As significâncias foram testadas por 1000 permutações. Nos testes de AMOVA, as amostras de *P. reticulatum* foram analisadas de duas formas: primeiro com todos os indivíduos como um único grupo ou separados em dois grupos (um grupo com os indivíduos da bacia do Paraguai e outro grupo com as amostras do Baixo Paraná). As mesmas análises em *P. corruscans* foram conduzidas de duas maneiras: um único grupo composto por todas as populações ou dois grupos (um grupo com as populações da bacia do Paraguai e Baixo Paraná e outro com amostras do Alto Paraná).

Análises bayesianas foram conduzidas através do programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), para verificar o número real de populações (K) entre as amostras de cada espécie. Foi permitido o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture model*) a fim de permitir uma resolução máxima, uma vez que este parâmetro assume que cada indivíduo vem exclusivamente de uma das populações (K) e é mais indicado para verificar uma estruturação populacional sutil (Pritchard et al., 2000). Foram utilizados alelos correlacionados, 20 réplicas para cada valor de K, 500.000 gerações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com períodos de “burn-in” de 200.000, e assumindo K=2 a 12 em *P. corruscans* e K=2 a 11 em *P. reticulatum*. Posteriormente, para visualizar a extensão dos genótipos compartilhados entre as populações (*q*), foram feitas novas análises com 20 réplicas para K=2, admixture mode, 500.000 cadeias MCMC, e período de “burn in” de 100.000.

RESULTADOS

Pseudoplatystoma reticulatum

Considerando-se todas as populações e *loci* em conjunto, foi observada uma média de 9.4 alelos por *locus* (total de 94 alelos), riqueza alélica média de 7.029 e He média de 0.738. O microssatélite Prt3 foi o menos variável, apresentando 7 alelos e He média de 0.621 (Tabela 2). Prt25 foi o *locus* com um maior número de alelos (A=17), enquanto Prt34 apresentou maior He média (0.874). A maioria dos *loci* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2). Foram verificados desvios significativos ($P < 0.005$ após a correção de Bonferroni) para Prt5 na população de Ng, Prt 27 na localidade de Ta e Prt39 na população de Mir. O programa Micro-checker indicou a provável existência de alelos nulos para estes *loci*, possivelmente devido a um déficit de heterozigotos, o que pode ser visualizado pelos valores de Fis positivos significativos nestas localidades (Tabela 2). Também foi observada a possibilidade de alelos nulos para Prt3 (população de Cb), Prt5 (Mir) e Prt39 (Ng).

Na população Mir foi verificada a maior diversidade, com 89 alelos, riqueza alélica média de 6.429 e He média de 0.772 (Tabela 2). A localidade Pr apresentou o menor número de alelos e riqueza alélica média (A=58, Ar=5.766), porém a He foi de 0.766 (segundo maior valor de He). A menor He média (0.726) foi verificada na população de Cb. Como verificado anteriormente, três populações (Ng, Ta e Mir) apresentaram desvios significativos do EHW, porém apenas para um *locus* em cada (Tabela 2). Na população Cb foi verificada a ocorrência

de desequilíbrio de ligamento (DL) entre Prt34 e Prt27, Prt36 e Prt5; Prt39 com Prt25 e Prt5; Prt 36 e Prt27 ($P < 0.005$). Já na população Ng, DL ocorreu entre os microssatélites Prt39 e Prt34 ($P < 0.005$).

Tabela 2. Variabilidade genética de 10 *loci* microssatélites para seis populações de *P. reticulatum*.

<i>Locus</i>	Cb	Pa	Ta	Ng	Mir	Pr
Prt3						
<i>N</i>	27	22	12	20	27	9
<i>Na</i>	5	5	3	5	7	3
<i>Ar</i>	3.605	3.955	2.750	4.214	4.119	3.000
<i>Ho</i>	0.370	0.727	0.333	0.600	0.519	0.556
<i>He</i>	0.609	0.644	0.518	0.669	0.629	0.569
<i>EHW</i>	0.018	0.740	0.120	0.078	0.513	0.192
<i>Fis</i>	0.396	-0.133	0.367	0.106	0.178	0.024
Prt5						
<i>N</i>	27	20	12	20	26	10
<i>Na</i>	9	14	12	10	10	8
<i>Ar</i>	7.372	8.729	10.273	8.047	7.906	7.974
<i>Ho</i>	0.889	0.750	0.833	0.700	0.692	1.000
<i>He</i>	0.867	0.787	0.899	0.874	0.863	0.911
<i>EHW</i>	0.925	0.643	0.643	0.003*	0.032	1.000
<i>Fis</i>	-0.025	0.048	0.076	0.204	0.201	-0.104
Prt11						
<i>N</i>	27	22	12	20	27	9
<i>Na</i>	8	9	6	8	10	9
<i>Ar</i>	5.379	6.976	5.686	6.243	7.510	9.000
<i>Ho</i>	0.704	0.773	0.833	0.650	0.889	0.889
<i>He</i>	0.718	0.833	0.819	0.755	0.867	0.908
<i>EHW</i>	0.088	0.127	0.959	0.090	0.974	0.824
<i>Fis</i>	0.020	0.074	-0.018	0.142	-0.026	0.023
Prt12						
<i>N</i>	27	22	12	20	27	9
<i>Na</i>	5	6	5	4	6	5
<i>Ar</i>	4.017	5.042	4.250	3.441	4.814	5.000
<i>Ho</i>	0.556	0.727	0.500	0.700	0.778	0.778
<i>He</i>	0.616	0.736	0.565	0.633	0.726	0.758
<i>EHW</i>	0.302	0.355	0.753	0.722	0.983	1.000
<i>Fis</i>	0.100	0.012	0.120	-0.108	-0.073	-0.027
Prt25						
<i>N</i>	27	21	12	20	27	9
<i>Na</i>	10	13	7	11	11	6
<i>Ar</i>	6.655	8.639	6.390	7.379	7.112	6.000
<i>Ho</i>	0.852	0.857	0.667	0.600	0.704	0.667
<i>He</i>	0.782	0.840	0.804	0.714	0.745	0.784
<i>EHW</i>	0.563	0.523	0.480	0.020	0.509	0.082
<i>Fis</i>	-0.091	-0.021	0.178	0.163	0.056	0.158

N: número de indivíduos, *Na*: número de alelos por *locus*, *A*: número total de alelos, *Ar*: riqueza alélica, *Ho*: heterozigosidade observada, *He*: heterozigosidade esperada. *EHW*: testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg. *Fis*: coeficiente de endocruzamento. * $P < 0.005$ após a correção de Bonferroni. Em negrito os valores de *Fis* para os *loci* com possíveis alelos nulos.

Tabela 2. Continuação.

<i>Lócus</i>	Cb	Pa	Ta	Ng	Mir	Pr
Prt27						
<i>N</i>	27	22	12	20	28	10
<i>Na</i>	7	4	6	6	7	4
<i>Ar</i>	4.996	3.547	5.391	4.012	5.090	3.895
<i>Ho</i>	0.630	0.409	0.250	0.300	0.464	0.500
<i>He</i>	0.522	0.425	0.674	0.360	0.606	0.626
<i>EHW</i>	1.000	0.575	0.000*	0.090	0.019	0.166
<i>Fis</i>	-0.211	0.038	0.639	0.171	0.238	0.210
Prt30						
<i>N</i>	27	22	12	20	26	10
<i>Na</i>	8	8	6	10	9	5
<i>Ar</i>	5.292	6.289	5.248	7.324	5.802	4.895
<i>Ho</i>	0.667	0.727	0.667	0.750	0.769	0.700
<i>He</i>	0.682	0.792	0.703	0.829	0.757	0.737
<i>EHW</i>	0.422	0.118	0.895	0.251	0.855	0.153
<i>Fis</i>	0.023	0.083	0.054	0.098	-0.016	0.053
Prt34						
<i>N</i>	27	21	12	20	28	9
<i>Na</i>	11	10	11	9	11	8
<i>Ar</i>	7.877	7.905	9.663	7.564	8.342	8.000
<i>Ho</i>	0.778	0.714	0.917	0.850	0.821	1.000
<i>He</i>	0.833	0.856	0.920	0.874	0.874	0.902
<i>EHW</i>	0.110	0.272	0.566	0.178	0.647	0.852
<i>Fis</i>	0.067	0.169	0.004	0.029	0.061	-0.116
Prt36						
<i>Na</i>	27	21	12	20	21	9
<i>Ar</i>	7	9	8	8	6	5
<i>Ar</i>	5.866	7.384	7.415	7.320	5.230	5.000
<i>Ho</i>	0.778	0.857	1.000	0.950	0.619	0.778
<i>He</i>	0.805	0.863	0.866	0.876	0.772	0.732
<i>EHW</i>	0.685	0.647	0.757	0.183	0.132	0.352
<i>Fis</i>	0.034	0.007	-0.163	-0.087	0.202	-0.067
Prt39						
<i>N</i>	27	19	12	19	25	10
<i>Na</i>	9	8	6	7	12	5
<i>Ar</i>	7.203	5.873	5.490	5.511	8.365	4.895
<i>Ho</i>	0.704	0.579	0.583	0.474	0.560	0.600
<i>He</i>	0.829	0.767	0.801	0.745	0.881	0.737
	0.012	0.228	0.382	0.088	0.000*	0.383
	0.153	0.250	0.280	0.371	0.369	0.194
Total						
<i>A</i>	79	86	70	78	89	58
Média						
<i>N</i>	27	22	12	20	28	10
<i>A</i>	7.9	8.6	7.0	7.8	8.9	5.8
<i>Ar</i>	5.826	6.434	6.256	6.106	6.429	5.766
<i>Ho</i>	0.693	0.712	0.658	0.657	0.681	0.747
<i>He</i>	0.726	0.754	0.757	0.733	0.772	0.766
<i>EHW</i>	0.412	0.423	0.617	0.189	0.518	0.500
<i>Fis</i>	0.047	0.053	0.154	0.109	0.119	0.035

N: número de indivíduos, Na: número de alelos por *locus*, A: número total de alelos, Ar: riqueza alélica, Ho: heterozigidade observada, He: heterozigidade esperada. EHW: testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Fis: coeficiente de endocruzamento. * P<0.005 após a correção de Bonferroni. Em negrito os valores de Fis para os *loci* com possíveis alelos nulos.

Os índices *Fst* entre as populações de *P. reticulatum* apresentaram valores baixos a moderados que variaram de 0.00083 a 0.1016 (Tabela 3). Valores estatisticamente significativos ($P < 0.05$) foram verificados entre Cb, Pa, Ng e Mir (Bacia do Paraguai) e Pr (Bacia do Baixo Paraná). Também foi observada uma diferença significativa entre a população de Mir e de Cb, ambas da Bacia do Paraguai.

Tabela 3. Valores de *Fst* entre pares de populações de *P. reticulatum*.

	Paraguai				Baixo Paraná	
	Cb	Pa	Ta	Ng	Mir	Pr
Cb	-					
Pa	0.01688					
Ta	0.00579	0.00083				
Ng	0.00601	0.01451	0.00451			
Mir	0.01906*	0.01504	-0.01488	-0.01133		
Pr	0.10163*	0.09008*	0.03346	0.07446*	0.05443*	-

Em destaque os valores significativos, * $P < 0.05$, 1023 permutações.

As análises de AMOVA, considerando todas as populações como um único grupo, demonstrou a maior porcentagem da variação dentro das populações (97.93 %) e de 2.07 % entre as populações, ambas significativas ($P < 0.05$) (Tabela 4). Quando as populações foram divididas em dois grupos (Bacia do Paraguai e Bacia do Baixo Paraná), as análises de AMOVA revelaram 5.69% da variação entre os grupos e 93.46% entre os indivíduos dentro das populações, ambas estatisticamente significativas ($P < 0.05$). A variação entre as populações dentro dos grupos foi baixa, com valores de 0.85% e não significativa ($P > 0.05$).

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA), aplicando o índice *Fst* para todas as populações e grupos de populações de *P. reticulatum*.

Grupos	Tipo de variação	Componentes de variação	Porcentagem de variação (%)
1	Entre populações	0.05584	2.07*
	Dentro das populações	2.63643	97.93*
2	Entre os grupos	0.21311	5.69*
	Entre as populações dentro dos grupos	0.03163	0.85
	Entre indivíduos dentro das populações	3.50050	93.46*

1: análise de todas as populações como um único grupo, 2: análise através da divisão em dois grupos, um composto pelas populações da bacia do Paraguai e outro compreendendo a população do Baixo Paraná. *variação significativa ($P < 0.05$).

Os resultados do teste inicial no programa Structure indicaram $K=1$, sem divisão das populações em grupos distintos. As análises utilizando $K=2$ para verificar a extensão do fluxo

gênico entre as populações demonstraram que os genótipos estavam divididos entre todas as localidades com valores de q entre 0.438 a 0.572 atribuídos a cada um dos grupos (Figura 2).

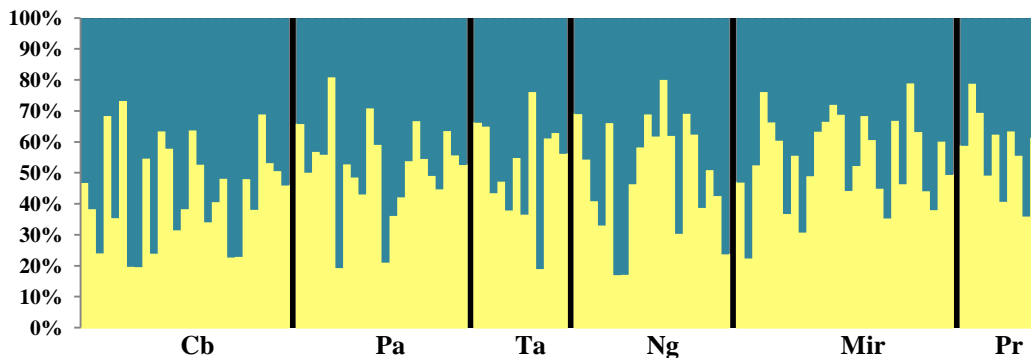


Figura 2. Estrutura “bar plot” das populações de *P. reticulatum*, estimada pelo programa Structure utilizando $K=2$. Cada cor indica um grupo com base em semelhanças genótípicas. As legendas das populações (Cb-Pr) estão indicadas na tabela 1.

Pseudoplatystoma corruscans

Foi observado um total de 150 alelos (média de 18.75 alelos por *locus*), Ar média de 9.590 e H_e média de 0.670 entre todos os *loci* e populações. Todos os microssatélites foram polimórficos ao menos em uma localidade (Tabela 5). O *locus* Prt25 foi o menos diverso, apresentando-se monomórfico na maioria das populações (Cb, Pa, Ta, Ve e Pp). Entre as populações onde foi polimórfico, apresentou até 2 alelos e H_e média de 0.015. Prt3 também foi monomórfico em algumas populações (Ve e Pp) e apresentou uma variação de 2 a 3 alelos e H_e média de 0.111. O maior número de alelos foi encontrado no *locus* Prt36 ($A=44$) enquanto Prt 27 demonstrou maiores valores de H_e (H_e média=0.952) (Tabela 5).

A população de Ve apresentou os valores mais baixos de diversidade ($A=76$, Ar média=8.044, H_e média=0.624), enquanto na população de Ta foi verificado o maior valor de H_e médio (0.691) e na localidade de Ng a maior quantidade de alelos ($A=105$, Ar média=10.715). A maioria dos microssatélites e populações encontrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Desvios significativos ($P<0.006$ após a correção de Bonferroni) do EHW foram detectados para Prt5 na população de Taq. O valor positivo de Fis foi significativo para este *locus* e o programa Micro-checker indicou a provável existência de alelos nulos devido a um déficit de heterozigotos (Tabela 5). Também foi observada a probabilidade de alelos nulos para Prt3 e Prt25 na população de Pr. Foi verificado desequilíbrio de ligamento entre Prt27 e Prt36 na população Ng ($P<0.006$). Na população de

Ve os DL foram entre os microssatélites Prt 5 com 39, 30, 27 e 12; Prt30 com 12, 27 e 39; Prt 27 com 12 e 39 ($P < 0.006$).

Tabela 5. Variabilidade genética de 8 *loci* microssatélites para sete populações de *P. corruscans*.

Lócus	Cb	Pa	Ta	Ng	Ve	Pp	Pr
Prt3							
<i>N</i>	33	23	22	30	30	29	30
<i>Na</i>	2	2	2	2	1	1	3
<i>Ar</i>	1.962	1.999	2.000	1.978	1.000	1.000	2.444
<i>Ho</i>	0.121	0.087	0.182	0.067	0.000	0.000	0.033
<i>He</i>	0.116	0.162	0.304	0.127	0.000	0.000	0.098
<i>EHW</i>	1.000	0.132	0.107	0.101	-	-	0.016
<i>Fis</i>	-0.049	0.470	0.408	0.477			0.663
Prt5							
<i>N</i>	33	22	22	32	30	28	29
<i>Na</i>	15	15	13	17	11	11	17
<i>Ar</i>	11.696	13.815	12.204	13.588	9.294	9.077	13.601
<i>Ho</i>	0.788	0.864	0.727	0.906	0.967	0.857	0.931
<i>He</i>	0.871	0.913	0.901	0.904	0.844	0.825	0.905
<i>EHW</i>	0.166	0.134	0.003*	0.254	0.009	0.830	0.549
<i>Fis</i>	0.097	0.056	0.196	-0.002	-0.149	-0.040	-0.029
Prt12							
<i>N</i>	33	22	21	25	29	28	29
<i>Na</i>	10	9	12	12	10	12	10
<i>Ar</i>	9.104	8.754	10.982	10.713	9.064	10.704	9.360
<i>Ho</i>	0.879	0.909	0.905	0.880	0.862	0.857	0.897
<i>He</i>	0.832	0.833	0.846	0.882	0.863	0.879	0.867
<i>EHW</i>	0.508	0.929	0.399	0.437	0.015	0.454	0.618
<i>Fis</i>	-0.057	-0.094	-0.072	0.002	0.001	0.026	-0.035
Prt25							
<i>N</i>	33	23	22	31	30	29	30
<i>Na</i>	1	1	1	2	1	1	2
<i>Ar</i>	1.000	1.000	1.000	1.581	1.000	1.000	1.844
<i>Ho</i>	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000
<i>He</i>	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.066
<i>EHW</i>	-	-	-	-	-	-	0.017
<i>Fis</i>							1.000
Prt27							
<i>N</i>	33	21	22	32	30	28	30
<i>Na</i>	18	19	21	24	18	19	24
<i>Ar</i>	16.148	18.014	19.176	19.347	14.844	16.361	19.490
<i>Ho</i>	0.909	1.000	1.000	0.969	0.867	1.000	0.867
<i>He</i>	0.947	0.955	0.958	0.957	0.907	0.942	0.952
<i>EHW</i>	0.074	0.869	0.847	0.636	0.087	0.947	0.017
<i>Fis</i>	0.041	-0.049	-0.045	-0.013	0.046	-0.063	0.091

N: número de indivíduos, Na: número de alelos por *locus*, A: número total de alelos, Ar: riqueza alélica, Ho: heterozigiosidade observada, He: heterozigiosidade esperada. EHW: testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Fis: coeficiente de endocruzamento. * $P < 0.005$ após a correção de Bonferroni. Em negrito os valores de Fis para os *loci* com possíveis alelos nulos.

Tabela 5. Continuação.

Locus	Cb	Pa	Ta	Ng	Ve	Pp	Pr
Prt30							
<i>N</i>	33	22	22	32	30	28	30
<i>Na</i>	12	8	10	13	8	8	11
<i>Ar</i>	10.162	7.632	9.753	11.201	6.798	6.805	9.464
<i>Ho</i>	0.727	0.773	0.955	0.844	0.867	0.679	0.900
<i>He</i>	0.833	0.821	0.867	0.843	0.780	0.797	0.854
<i>EHW</i>	0.344	0.304	0.280	0.119	0.769	0.166	0.954
<i>Fis</i>	0.128	0.060	-0.104	-0.001	-0.113	0.151	-0.055
Prt36							
<i>N</i>	32	22	18	29	26	27	24
<i>Na</i>	15	20	18	19	16	20	21
<i>Ar</i>	11.887	17.662	18.000	14.019	13.430	16.484	17.253
<i>Ho</i>	0.875	0.909	0.944	0.759	0.769	0.963	0.792
<i>He</i>	0.828	0.862	0.914	0.831	0.819	0.927	0.885
<i>EHW</i>	0.442	0.415	0.867	0.517	0.174	0.416	0.105
<i>Fis</i>	-0.058	-0.057	-0.034	0.089	0.062	-0.040	0.107
Prt39							
<i>N</i>	33	22	22	32	30	28	30
<i>Na</i>	14	11	9	16	11	8	16
<i>Ar</i>	10.701	10.082	8.391	12.954	8.922	6.998	12.267
<i>Ho</i>	0.758	0.864	0.682	0.875	0.767	0.750	0.733
<i>He</i>	0.778	0.838	0.740	0.856	0.779	0.749	0.814
<i>EHW</i>	0.068	0.435	0.250	0.300	0.025	0.817	0.266
<i>Fis</i>	0.026	-0.031	0.080	-0.023	0.016	-0.001	0.101
Total							
<i>A</i>	87	85	86	105	76	80	104
Média							
<i>N</i>	33	24	22	32	30	30	31
<i>Na</i>	10.88	10.63	10.75	13.13	9.50	10.00	13.00
<i>Ar</i>	9.083	9.870	10.188	10.673	8.044	8.554	10.715
<i>Ho</i>	0.632	0.676	0.674	0.666	0.637	0.638	0.644
<i>He</i>	0.650	0.673	0.691	0.679	0.624	0.640	0.680
<i>EHW</i>	0.372	0.460	0.458	0.338	0.180	0.605	0.318
<i>Fis</i>	0.018	0.051	0.061	0.076	-0.023	0.005	0.230

N: número de indivíduos, Na: número de alelos por *locus*, A: número total de alelos, Ar: riqueza alélica, Ho: heterozigiosidade observada, He: heterozigiosidade esperada. EHW: testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Fis: coeficiente de endocruzamento. * P<0.005 após a correção de Bonferroni. Em negrito os valores de Fis para os *loci* com possíveis alelos nulos.

Uma análise interpopulacional indicou valores de *Fst* que variaram de 0.00008a 0.09716. As diferenças significativas foram entre Ve e Pp (Bacia do Alto Paraná) e as localidades de Cb, Pa, Ta, Ng, Pr (Bacias do Paraguai e Baixo Paraná) (P<0.05) (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de Fst entre pares de populações de *P. corruscans*.

	Paraguai			Alto Paraná		Baixo Paraná	
	Cb	Pa	Ta	Ng	Ve	Pp	Pr
Cb	-						
Pa	0.00362						
Ta	-0.00224	0.00378					
Ng	-0.00369	-0.00799	-0.01466				
Ve	0.09196*	0.04418*	0.09716*	0.08152*			
Pp	0.06170*	0.03443*	0.06028*	0.04010*	0.01004		
Pr	0.00008	-0.01122	-0.00334	-0.00350	0.04928*	0.02582*	-

Em destaque os valores significativos, * P<0.05, 1023 permutações.

Nas análises de AMOVA, considerando-se todas as populações como um único grupo, a maior porcentagem da variação ocorreu entre os indivíduos dentro das populações (97.10%) e menor entre as populações (2.85%), porém ambas significativas (P<0.05) (Tabela 7). A análise das populações divididas em dois grupos demonstrou uma variação maior e significativa entre os grupos (3.53%, P<0.05), não significativa entre as populações dentro dos grupos (0.71%, P>0.05); e a maior variação entre os indivíduos dentro das populações (95.75%, P<0.05).

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA). aplicando o índice Fst para todas as populações e grupos de populações de *P. corruscans*.

Grupos	Tipo de variação	Componentes de variação	Porcentagem de variação (%)
1	Entre populações	0.04590	2.85*
	Dentro das populações	1.56358	97.15*
2	Entre os grupos	0.08899	3.53*
	Entre as populações dentro dos grupos	0.01797	0.71
	Entre indivíduos dentro das populações	2.41325	95.75*

1: todas as populações como um único grupo, 2: dois grupos, um composto pelas populações da bacia do Paraguai e Baixo Paraná e outro compreendendo as populações da bacia do Alto Paraná, *variação significativa (P<0.05).

As análises de estruturação genética do programa Structure indicaram K=2, com as populações divididas em dois grupos genéticos distintos, um da população de Cb (Bacia do Paraguai) e outro das populações de Ve e Pp (Bacia do Alto Paraná) (Figura 3). Os valores de q foram maiores para estas populações Cb (0.793 ao grupo 1), Ve (0.898 ao grupo 2) e Pp (0.792 ao grupo 2), enquanto as outras localidades apresentaram genótipos atribuídos à ambos

grupos. No rio Paraná foi verificada aproximadamente metade de atribuição de seu genótipo a cada grupo inferido (0.562 ao grupo 1 e 0.438 ao grupo 2).

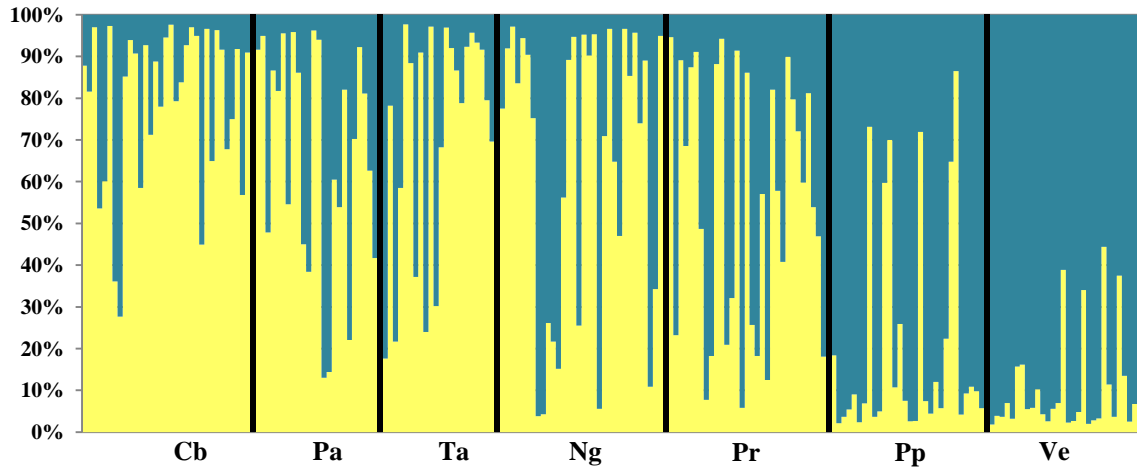


Figura 3. Estrutura “bar plot” das populações de *P. corruscans*, estimada pelo programa Structure utilizando $K=2$. Cada cor indica um grupo com base em semelhanças genóticas. As legendas das populações (Cb-Ve) estão indicadas na tabela 1.

DISCUSSÃO

Análises intrapopulacionais

Os dados obtidos neste trabalho para *P. reticulatum* demonstraram valores altos de diversidade. Algumas diferenças observadas na quantidade de alelos entre as populações possivelmente está relacionada com o número amostral, pois os *loci* foram polimórficos em todas as localidades e os dados de riqueza alélica demonstraram uma variação sutil entre as populações. Estes dados condizem com o comumente observados em peixes de água continental (DeWoody e Avise, 2000) e em outros estudos com esta espécie (Abreu et al., 2009).

Em *P. corruscans*, apesar de dois microssatélites apresentarem baixa diversidade, todos os seis microssatélites restantes também apresentaram alto polimorfismo e H_e . A diversidade entre as sete populações desta espécie, apesar do diferente número amostral, também foi média a alta entre todos os *loci*. Estes resultados condizem com a diversidade já observada para esta espécie em populações da bacia do Paraguai, Paraná e São Francisco (Pereira et al., 2009; Carvalho et al., 2012).

A variação intrapopulacional é gerada primariamente através de mutação e recombinação (Templeton, 2011). Porém, as mutações são raras e o fator que mais rapidamente contribuiu para o aumento da diversidade intrapopulacional é a imigração de indivíduos de outras populações, através de fluxo gênico (Laikre et al., 1999). Como as espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans* são migradoras (Resende, 2003; Carolsfeld et al., 2003; Godinho et al., 2007), os altos valores de variabilidade genética observados podem estar relacionados com o contato entre as populações, aumentando a heterozigosidade.

Entre os diversos tipos de análises que disponibilizam, os marcadores microsatélites permitem verificar desvios das frequências genótípicas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, possibilitando detectar fragmentação populacional, migração e seleção (Frankham e Briscoe, 2002). Neste estudo, desvios significativos do EHW foram observados em poucos *loci* e populações para ambas as espécies, os quais estavam principalmente relacionados com um excesso de homozigotos e altos valores positivos e significativos de Fis. Entre os fatores mais comuns responsáveis por desvios do EHW em microsatélites está a existência de alelos nulos, endogamia, efeito Wahlund, o alto número de alelos por *locus* e amostragem não randômica (García de Leon et al., 2007). Uma possível causa dos desvios do EHW observados neste estudo podem ser devido ao número limitado de indivíduos analisados em algumas localidades ($N \leq 20$) ou a algum tipo de amostragem não randômica, onde a diversidade alélica dos microsatélites, altamente polimórficos, não pôde ser acessada corretamente, aumentando a quantidade de homozigotos detectados para alguns *loci* em algumas populações. Porém, nenhuma população apresentou desvios para todos os *loci*.

Entre as possíveis causas dos desvios do EHW, o excesso de homozigotos também pode estar relacionado com a ocorrência de alelos nulos, comum em microsatélites (Dakin e Avise, 2004). A ocorrência de alelos nulos é causada por uma baixa eficácia de hibridação dos *primers* devido a mutações pontuais em uma ou mais regiões da sequências flanqueadoras dos microsatélites onde os *primers* iriam se anelar (Dakin e Avise, 2004). Assim, os poucos desvios do EHW verificados neste trabalho também podem ser devido à ocorrência de alelos nulos para estes microsatélites, porém, em frequências baixas, limitados a uma ou duas populações. A maioria dos estudos que encontram *loci* com possibilidade de alelos nulos não os excluem das análises, já que os efeitos nos padrões de diversidade geralmente são pequenos quando as frequências de alelos nulos são baixas a moderadas (Cebrián, 2011).

Desequilíbrios de ligamento entre microsatélites podem indicar uma ligação física entre os *loci*, porém, são principalmente causados por fatores populacionais como

estruturação, endogamia e alto índice de homozigotos presentes na população, e não porque estejam realmente ligados (Templeton, 2011). Neste estudo foram verificados DL significativos nas populações de Cuiabá e Negro para *P. reticulatum* e no rio Verde para *P. corruscans*. Como nenhum par de *loci* apresentou DL em todas as localidades, é proposto que haja independência física entre estes marcadores. Já a causa dos DL em algumas populações pode estar relacionado com algum tipo de estruturação ou diferenciação genética dentro da população.

Análises interpopulacionais

O comportamento de *homing* tem sido sugerido para diversas espécies de peixes com hábitos migratórios (Batista e Gomes, 2006; Piorski et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Pereira et al., 2009). Durante a reprodução as espécies estariam corretamente atribuídas à suas populações, uma vez que retornariam sempre ao mesmo local, levando a uma diferenciação genética entre as populações; já os indivíduos que estão em sua época de alimentação encontram-se "misturados" com outras populações, ocasionando menor diferenciação genética (Pereira et al., 2009). Desta forma, é indicado que, para verificar a estruturação populacional em espécies migratórias, deve-se coletar os indivíduos em sua época de reprodução.

Estudos utilizando um grupo de microssatélites distintos (Revaldaves et al., 2005) tem revelado uma diferenciação baixa a moderada, porém significativas entre populações das espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans* (Abreu et al., 2009; Pereira et al., 2009). Segundo estes trabalhos, mesmo localidades próximas geograficamente, como rios da bacia do Paraguai (Cb, Ta e Ng) em *P. corruscans* (F_{st} entre 0.03435 a 0.16349) e rios Paraguai e Jauru em *P. reticulatum* ($F_{st}=0.22$) apresentaram estruturação genética, o que pode estar relacionado com o comportamento de *homing* nestas espécies.

Estes dados interpopulacionais não condizem com verificado neste trabalho, onde foi observada alta similaridade genética entre a maioria das populações de *P. reticulatum* e todas as populações de *P. corruscans* dentro da bacia do Paraguai, com diferenciação não significativa, mesmo entre populações coletadas em sua época de reprodução. É possível que esta ausência de diferenciação genética esteja relacionada com uma população panmítica na bacia do Paraguai, e um fluxo gênico maior do que o esperado para estas espécies. Os movimentos migratórios comuns a estas espécies podem estar ocasionando a ausência de diferenciação significativa entre as populações mais próximas da bacia do Paraguai, o que

também explicaria a alta diversidade encontrada nestas populações. Este padrão pode ter surgido pelas migrações anuais, atuando na homogeneização entre as populações mais próximas. Estudos com a espécie migratória *Prochilodus lineatus*, demonstraram ausência de estruturação genética entre populações do rio São Francisco, mesmo coletadas em sua época de reprodução, onde existe a possibilidade da reprodução anual ser um agente de homogeneização dos diferentes pools genéticos (Carvalho-Costa et al., 2008).

Porém, também existe a possibilidade das análises genéticas deste trabalho não terem conseguido acessar uma sutil estruturação nas populações destas espécies dentro das bacias hidrográficas de sua ocorrência. Isto pode ser devido à erros de amostragem, com a possível coleta de indivíduos provenientes de diversas populações; ou ao relativo baixo número de indivíduos amostrados em algumas localidades, que não foram suficientes para visualizar as diferenças alélicas interpopulacionais.

De acordo com Wright (1978), valores entre 0.00 e 0.05 indicam baixo nível de diferenciação genética, valores entre 0.05 e 0.25 indicam diferenciação genética moderada, e valores acima de 0.25 indicam alta diferenciação. No entanto, é importante ressaltar que, mesmo as baixas estimativas de F_{st} (<0.05) podem refletir uma importante diferenciação genética entre as populações (Balloux e Lugon- Moulin, 2002). A manutenção da diversidade genética depende da preservação do fluxo gênico entre as populações de um sistema (Laikre et al, 2005). Portanto, a estruturação populacional poderia manter a existência de populações genéticas distintas e evitar a panmixia. Por outro lado, o fluxo de genes assegura a introdução de variações genéticas nas populações, evitando endogamia e a perda de variação genética nas espécies como um todo (Laikre et al., 1999; Templeton, 2011). Assim, embora a magnitude dos valores de F_{st} na diferenciação populacional ainda seja alvo de debates, em termos de conservação, é recomendável considerar a existência de subdivisões entre as populações do que uma única população, o que poderia resultar na depleção da variação genética (Laikre et al., 2005).

Apesar da alta similaridade entre rios próximos, os dados deste estudo demonstraram diferenciação genética entre localidades mais distantes. Dentro da bacia do Paraguai a população de *P. reticulatum* do rio Cuiabá foi significativamente diferenciada do rio Miranda. Além disso, todos os rios da bacia do Paraguai, com exceção do rio Taquari, apresentaram diferenciação genética do rio Paraná (Baixo Paraná). Não existem estudos específicos sobre a migração de *P. reticulatum*, como por exemplo, o alcance que realiza, porém,

estadiferenciação genética pode ser devida a distância geográfica e a capacidade máxima de deslocamento desta espécie.

A comparação entre estas bacias na espécie *P. corruscans* demonstrou um cenário distinto, sem diferenciação significativa entre a bacia do Paraguai e Baixo Paraná, o que pode estar relacionado com diferentes comportamentos migratórios entre estas espécies. Talvez *P. corruscans* migre por distâncias maiores e ocorra maior fluxo gênico entre os rios da bacia do Paraguai e Baixo Paraná quando comparada com *P. reticulatum*. Outra possibilidade são diferenças do período reprodutivo entre as espécies. A migração destes peixes se inicia com a movimentação para planícies alagadas do rio Paraguai e Paraná para se alimentar e a subida para os rios tributários para reprodução (Pereira et al., 2009). Como as amostras no rio Paraná foram feitas no final da época de alimentação e início da migração reprodutiva (entre setembro e outubro) é possível que indivíduos de *P. reticulatum* já tivessem iniciado a migração, subindo para os rios da bacia do Paraguai, o que aumentaria a diferenciação entre as localidades. Já os indivíduos de *P. corruscans*, caso ainda estivessem na área de alimentação (rio Paraná), ocasionariam maior similaridade genética entre as amostras.

Em relação à bacia do Alto Paraná, onde foram analisadas apenas amostras de *P. corruscans*, a diferenciação foi significativa com os rios da bacia do Paraguai e Baixo Paraná, o que possivelmente está relacionada com a distância geográfica entre os locais analisados. A estruturação genética relevada pelo programa Structure neste estudo demonstrou a presença de dois grupos distintos dentro da espécie, que corresponderam justamente às regiões mais distantes (rios Cuiabá e Verde+Paranapanema) localizados entre estas bacias hidrográficas distintas.

Para esta mesma espécie, a diferenciação entre localidades mais próximas verificada neste estudo, como o rio Paraná (Baixo Paraná) e o rio Paranapanema (Alto Paraná), podem resultar do isolamento entre estas bacias até 1983 pela barreira natural de Salto de Sete Quedas e atualmente pela barragem da usina de Itaipú (Sekine et al., 2002). De acordo com Godinho et al. (2002) é difícil que espécies migradoras como *P. corruscans* sejam capazes de atravessar as barreiras. Ao mesmo tempo, apesar das diferenças significativas entre estas localidades, aproximadamente metade da atribuição do rio Paraná (0.438) foi ao grupo do Alto Paraná, refletindo um possível fluxo gênico. Como o local de coleta da população Pr foi justamente após a junção dos rios Paraná e Paraguai, alguns indivíduos de ambas as bacias podem se reproduzir neste local. Pereira et al. (2009) verificou ausência de diferenciação entre

o baixo Paraná e o rio Paranapanema (Alto Paraná) e sugeriu que alguns indivíduos possam passar pela barragem através das escadas de peixes implantadas na usina.

Carvalho et al. (2012) utilizaram DNA mitocondrial e microssatélites para verificar a diferenciação entre populações de *P. corruscans* da bacia do São Francisco e bacia do Paraguai/Paraná. Os microssatélites utilizados por estes autores foram os mesmos utilizados por Abreu et al. (2009) e Pereira et al. (2009) e disponibilizaram um valor de F_{st} de 0.18, altamente significativos entre as bacias. Estes dados, em conjunto com os resultados deste estudo, indicam que existe diferenciação genética para *P. corruscans* entre as bacias geográficas de sua ocorrência (Paraguai, Paraná e São Francisco).

Os resultados deste trabalho fornecem informações sobre a diversidade genética e padrões de diferenciação populacional para estas espécies e representam a primeira análise genética das populações de *P. reticulatum* abrangendo os rios aqui analisados. Adicionalmente, a diferenciação genética distinta verificada entre as espécies pode ser útil para futuros estudos ecológicos e de migração nestas espécies. Os valores de diversidade podem ser futuramente utilizados no manejo destas espécies em cultivo e para verificar possíveis alterações populacionais.

CAPÍTULO 3

Microssatélites e genes na detecção de hibridação entre duas espécies do gênero *Pseudoplatystoma* através de análises bayesianas

RESUMO

Os microssatélites, apesar de seu alto polimorfismo, possuem potencial para distinguir diferentes *taxa* e seus híbridos, devido a alta divergência alélica que pode ocorrer entre as espécies. Além disso, análises bayesianas permitem a atribuição dos genótipos dos indivíduos de acordo com suas frequências alélicas, o que é muito importante para inferências evolutivas e populacionais em ambientes onde ocorra hibridação. Neste estudo foi testado o potencial de oito microssatélites em distinguir as espécies de bagres Neotropicais *Pseudoplatystoma reticulatum* e *P. corruscans* e identificar seus híbridos e introgressão genética. Também foram realizados testes através de diferentes combinações de marcadores microssatélites e genes, a fim de acessar a probabilidade de identificação dos indivíduos. Os microssatélites apresentaram diferenças bem estabelecidas entre as espécies, tanto no que se refere ao tamanho como a frequência alélica, confirmadas por dois grupos estruturados claramente distintos correspondentes a cada uma das espécies. Os dados populacionais indicaram que os desvios do EHW, excesso ou déficit de heterozigotos e desequilíbrios de ligamento podem ser fatores importantes para detectar hibridação e introgressão neste grupo de peixes. Os testes bayesianos demonstraram que os microssatélites foram extremamente informativos para identificar a hibridação nas amostras e úteis em estudos genético populacionais. Porém, como estas regiões do DNA são muito polimórficas, quando o objetivo é a identificação individual, a utilização apenas dos *loci* diagnósticos (totalmente fixos entre as espécies) em conjunto com marcadores de genes pode permitir uma identificação mais precisa. Além disso, o uso de dois ou mais dos métodos bayesianos, como os programas Structure e NewHybrids, foram a melhor opção. Estes resultados disponibilizam uma gama de marcadores microssatélites para serem aplicados em futuras investigações de hibridação e introgressão genética neste grupo de peixes, assim como em projetos de conservação, produção e manejo destas espécies.

INTRODUÇÃO

Uma etapa primordial para investigar eventos de hibridação interespecífica ou introgressiva em ambientes naturais são metodologias que permitam uma identificação e discriminação precisa entre as espécies parentais e linhagens híbridas F1, F2 e retrocruzamentos (Toledo-Filho et al., 1994; Allendorf et al., 2001; 2010). Informações taxonômicas fornecem dados importantes para estudos de hibridação, porém, pode ser difícil e duvidoso distinguir híbridos unicamente através parâmetros morfológicos, principalmente gerações híbridas avançadas, as quais podem ser heterogêneas (Demandt e Bergek, 2009; Allendorf et al., 2010). Inúmeros marcadores de regiões do DNA nuclear tem sido desenvolvidos e aplicados com sucesso no estudo da hibridação e introgressão genética, os quais independem das variações morfológicas (Machado-Schiaffino et al., 2010; Dubut et al., 2010; Bohling et al., 2013; Khosravi et al., 2013).

Marcadores moleculares diagnósticos e monomórficos entre as espécies (como genes nucleares sem variações alélicas entre as espécies) possibilitam identificar espécies e híbridos com precisão através de mutações espécie-específicas ou fragmentos eletroforéticos de tamanhos diagnósticos (Rubidge et al., 2001; Hashimoto et al., 2011; Porto-Foresti et al., 2013). Por outro lado, marcadores polimórficos com variação intraespecífica, como os microsátélites (SSR - *simple sequence repeat*), por seguirem modelos evolutivos simples (marcadores neutros), e serem facilmente genotipados através de PCR, têm sido amplamente aplicados em estudos de hibridação (Ostberg e Rodriguez 2004; Dubut et al., 2010; Bohling et al., 2013; Khosravi et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Com o uso de microsátélites a distinção dos *taxa* pode ser realizada através da comparação das frequências e tamanhos alélicos entre as espécies, onde a acumulação de mutações pode contribuir mais substancialmente para a diferenciação interespecífica do que ao observado entre as populações das espécies (Roques et al., 1999). Além disso, desequilíbrios genéticos populacionais e valores de heterozigosidade, disponibilizados pelos marcadores microsátélites, podem ser extremamente úteis e informativos no estudo da hibridação (Hansen et al., 2001; Sanz et al., 2009).

As espécies de peixes Neotropicais *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma corruscans* são amplamente distribuídas por rios Sul Americanos (Lundberg e Littman, 2003; Buitrago-Suárez e Burr, 2007) e tem sido extensivamente utilizadas para a produção de híbridos na aquicultura brasileira (Campos, 2010; Hashimoto et al., 2013a). Os ambientes

naturais destas espécies estão sofrendo contaminação genética através de retrocruzamentos, o que acredita-se estar sendo ocasionado pelo contato de híbridos de pisciculturas com as populações parentais (Veríssimo et al., 2005; Bignotto et al., 2009; Prado et al., 2012a; Prado et al., Capítulo 1).

Em casos como este, onde existe fertilidade híbrida e hibridação introgressiva, a identificação precisa de retrocruzamentos na natureza pode requerer um número alto de marcadores nucleares, devido as várias combinações alélicas resultantes da mistura genética entre as espécies (Toledo-Filho et al., 1994; Boecklen e Howard, 1997; Vähä e Primmer, 2006; Sanz et al., 2009). A maioria dos estudos de hibridação utiliza 6 a 10 marcadores nucleares, porém, no caso dos microssatélites, como são altamente variáveis, é recomendada uma maior quantidade de *loci* para identificar a hibridação introgressiva avançada, especialmente se a diferenciação alélica entre as espécies é baixa (Allendorf et al., 2001; Vähä e Primmer, 2006; Sanz et al., 2009).

Estudos disponibilizaram três marcadores de genes nucleares com diferenças fixas entre as espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans*, eficazes na distinção entre os *taxa* e para documentar a presença de híbridos e introgressão na natureza (Prado et al., 2011; Hashimoto et al., 2013a; Prado et al., capítulo 1). Carvalho et al., (2013) demonstraram que oito microssatélites previamente desenvolvidos para *P. corruscans* por Revaldaves et al. (2005) apresentaram diferenças entre as espécies e possibilitaram uma identificação de amostras contendo híbridos através de métodos de atribuição dos indivíduos. Prado et al. (*in press*) disponibilizaram 16 microssatélites para *P. reticulatum*, que apresentaram 100% de transferabilidade em *P. corruscans*, e entre eles, seis apresentaram tamanhos alélicos distintos entre as espécies, com potencial para análises interespecíficas.

Tendo em vista a importância de maior número de marcadores genéticos para avaliar a hibridação introgressiva nas populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans*, este trabalho buscou utilizar alguns microssatélites disponíveis para estas espécies (Prado et al., *in press*) para verificar a extensão da divergência genética interespecífica e testar seu potencial na identificação dos híbridos. Também objetivou-se utilizar análises bayesianas na identificação da hibridação testando diferentes quantidades e tipos de marcadores genéticos (microssatélites e genes nucleares).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas populações das espécies parentais (*P. reticulatum*: N=119 amostras dos rios Paraguai, Cuiabá, Taquari, Negro, Miranda e Paraná; *P. corruscans*: N=202 amostras dos rios Paraguai, Cuiabá, Taquari, Negro, Verde, Paranapanema e Paraná) e duas populações com ocorrência de hibridação (rio Aquidauana: N=30 e rio Mogi-Guaçu: N=43). Estas amostras foram as mesmas analisadas por Prado et al. (Capítulo 1), que realizaram sua identificação genética utilizando os genes nucleares RAG2 (*Recombination activating gene 2*), EF1 (*elongation factor 1*) e ribossômico 18S (Prado et al., 2011; Hashimoto et al., 2013a) e cederam a genotipagem destes genes para este trabalho.

Também foram analisados oito microssatélites (Prt3, Prt 5, Prt12, Prt25, Prt27, Prt30, Prt36 e Prt39) (Prado et al. *in press*). Os dados alélicos destes *loci* para as populações parentais foram cedidos por Prado et al. (Capítulo 2), enquanto as populações de Aquidauana e Mogi-Guaçu foram genotipadas neste trabalho.

Foi realizada extração e purificação do DNA genômico total das populações com hibridação, de acordo com o protocolo descrito no kit comercial Wizard genomic DNA purification kit (Promega). A amplificação dos microssatélites foi realizada através de PCR (*Polymerase chain reaction*) utilizando as concentrações e programas descritos por Prado et al. (Capítulo 2). Os produtos de PCR foram confirmados em gel de agarose a 1% agarose utilizando o DNA ladder de 100 pares de bases (pb) DNA ladder (Invitrogen) corado com SYBR Safe™ (Applied Biosystems) e posteriormente aplicados em analisador genético automático ABI PRISM_3730 (Applied Biosystems). O tamanho dos alelos foram estabelecidos e marcados utilizando o programa Gene Mapper 3.7 (Applied Biosystems).

Análises dos dados e programas

Análises interespecíficas

A fim de visualizar as diferenças alélicas interespecíficas, as populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans* foram agrupadas por espécie. A diversidade genética e diferenças dos alelos entre as espécies foram medidas através do número de alelos, variação de tamanho dos alelos, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) através do programa Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998). A divergência relacionada à variação e frequência dos alelos entre as

espécies foi medida através do índice F_{st} (Weir e Cockerham, 1984) utilizando o programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005). Através deste mesmo programa também foram feitas análises de variância molecular (AMOVA) para acessar a variação entre as espécies e entre as populações dentro de cada espécie, sendo que as significâncias foram testadas por 1000 permutações. Também foram obtidos valores de R_{st} (Rousset, 1996; Goodman, 1997) que consiste em uma variação dos índices de diferenciação genética com base no tamanho alélico, implementado no programa GenePop 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). As frequências alélicas para todos os *loci* por espécie foram obtidas através do programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002) e os alelos exclusivos para cada espécie foram identificados manualmente.

A fim de verificar o número real de K entre todas as amostras ($N=394$) e visualizar o número de grupos diferenciados entre as espécies parentais e as populações com híbridos, o valor de K foi inicialmente estimado através do programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), assumindo ancestralidade misturada, alelos correlacionados, testados valores de $K=2$ a 10, 20 réplicas para cada valor de K , 500.000 cadeias MCMC e 100.000 gerações “*burn-in*”.

Identificação de híbridos e introgressão genética

Foram obtidos dados de diversidade genética nas populações com híbridos (A , variação de tamanho dos alelos, H_o e H_e) utilizando os parâmetros e programas descritos anteriormente. Os valores de F_{is} (coeficiente de endogamia) e os cálculos de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e desequilíbrio de ligação foram analisados através de testes exatos de Fisher, implementados no programa *GenePop* 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Os valores de significância ($P<0.05$) foram ajustados de acordo com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Posteriormente, foram realizados testes para verificar as probabilidades de identificação de híbridos F1 e híbridos avançados utilizando análises bayesianas. Foram feitos testes utilizando somente os marcadores variáveis microssatélites (Prt3, 5, 12, 25, 27, 30, 36 e 39); utilizando todos os marcadores (oito microssatélites e genes RAG2, EF1 e 18S); ou selecionando apenas os marcadores totalmente diagnósticos entre as espécies.

Através do programa Structure foram obtidos os valores de q de cada indivíduo atribuído a cada espécie parental, *P. reticulatum* (q_1) ou *P. corruscans* (q_2). Foi estimado $K=2$, ancestralidade misturada, 20 réplicas para cada valor de K , 500.000 cadeias MCMC, 100.000 gerações “*burn-in*” e utilizada a opção “*popflag*” para as espécies parentais (I : P .

reticulatum, 2: *P. corruscans*, 0: populações com hibridação). Foi utilizado um intervalo de confiança de 90% para discriminar os indivíduos como espécies parentais, conforme proposto por estudos simulados (Sanz et al., 2009; Aboim et al., 2010), sendo que os exemplares com valores menores de atribuição a determinada espécie ($0.1 \leq q \leq 0.9$) foram identificados como indivíduos com algum nível de mistura entre as espécies, ou híbridos.

O programa NewHybrids 1.1 (Anderson e Thompson, 2002) foi utilizado para estimar a probabilidade total (Q) de cada indivíduo pertencer a uma das seis classes: parental 1 *P. reticulatum* (P_r), parental 2 *P. corruscans* (P_c), primeira geração de híbridos interespecíficos (F1), segunda geração de híbridos (F2), retrocruzamentos de F1 com o parental 1 (R_{Pr}) ou retrocruzamentos de F1 com o parental 2 (R_{Pc}). Os testes foram baseados em 100.000 varreduras MCMC após um período de *burn-in* de 100.000, com as opções de z e s para indicar as espécies puras ($z0s$: *P. reticulatum* e $z1s$: *P. corruscans*). Esta classificação foi realizada utilizando os marcadores que permitiram uma melhor identificação dos indivíduos testados através do programa Structure.

RESULTADOS

Análises interespecíficas

Entre todos os *loci*, foi verificado um total de 71 alelos exclusivos em *P. reticulatum* ($A=94$), 124 alelos exclusivos em *P. corruscans* ($A=150$) e 24 alelos compartilhados entre as espécies (Tabela 1). A extensão de tamanho dos alelos foi de 99 a 306 pb em *P. reticulatum* e de 69 a 433 pb em *P. corruscans*. Os *loci* Prt3, 12, 30 e 36 apresentaram as maiores diferenças alélicas interespecíficas, sem alelos compartilhados e tamanhos que não se sobrepuseram. Prt36 apresentou a maior diferença de tamanho alélico entre as espécies (maior alelo de *P. reticulatum*=272 pb e menor alelo de *P. corruscans*=326 pb). A H_e variou de 0.530 a 0.869 em *P. reticulatum* e de 0.015 a 0.952 em *P. corruscans* (Tabela 8). Prt25 apresentou as maiores diferenças de diversidade entre as espécies, com *P. reticulatum* apresentando $A=17$ e $H_e=0.782$, e *P. corruscans* com $A=2$ alelos e $H_e=0.015$ (Tabela 1).

O índice F_{st} revelou uma diferenciação altamente significativa entre as espécies para todos os microssatélites (F_{st} médio= 0.35612, $P=0.000$). Os dados de R_{st} demonstraram uma diferenciação baixa e não significativa para o *locus* Prt5 ($P>0.05$) e valores que variaram de

0.7028 a 0.9968, altamente significativos para o restante dos *loci* (Rst médio= 0.9008, P=0.000) (Tabela 1).

Tabela 1. Diversidade genética por espécie, por *locus* e diferenciação genética entre as espécies através dos índices de Fst e Rst.

Lócus	A (Ae)		Tamanho dos alelos (pb)		He		Fst	Rst
	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc		
Prt3	7 (7)	3 (3)	184-197	159-161	0.621	0.111	0.72772*	0.9968*
Prt5	16 (7)	24 (13)	219-280	221-297	0.869	0.905	0.16014*	0.0006
Prt12	7 (7)	13 (13)	272-292	296-320	0.678	0.865	0.29307*	0.9574*
Prt25	17 (15)	2 (0)	167-207	169-171	0.782	0.015	0.70195*	0.8333*
Prt27	9 (6)	31 (28)	211-233	225-293	0.530	0.952	0.22317*	0.8379*
Prt30	14 (14)	13 (13)	99-133	69-95	0.760	0.831	0.28144*	0.9116*
Prt36	10 (10)	44 (44)	232-272	326-433	0.833	0.872	0.24203*	0.9345*
Prt39	14 (5)	20 (10)	268-306	255-288	0.828	0.807	0.28284*	0.7028*

Pr: *P. reticulatum*, Pc: *P. corruscans*, A: número total de alelos, Ae: alelos exclusivos, pb: pares de bases, He: heterozigiosidade esperada. Variação significativa, *P=0.0000. Em destaque os *loci* diagnósticos.

As análises de AMOVA demonstraram a maior porcentagem da variação dentro das populações dentro dos grupos (64.39 %, P=0.000). A variação entre as espécies foi de 33.69%, altamente significativa (P=0.000), enquanto a variação entre as populações dentro de cada espécie foi menor, de 1.94%, porém, significativa (P<0.05) (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) de todos os *loci* microssatélites entre as espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans*

Tipo de variação	Componentes de variação	Porcentagem de variação (%)
Entre as espécies	1.31482	33.69*
Entre as populações dentro de cada espécie	0.07587	1.94*
Dentro das populações	2.51446	64.39*

Variação significativa, **P=0.0000 e *P<0.05.

A análise bayesiana inicial gerada pelo programa Structure indicou K=2 grupos correspondentes às duas espécies: *P. reticulatum* e *P. corruscans* (Figura 1). Todas as populações de *P. reticulatum* foram atribuídas a um único grupo claramente distinto das populações de *P. corruscans* (Figura 1). Entre todos os indivíduos de *P. reticulatum*, um espécime apresentou $q_1=0.860$ de seu genótipo atribuído a esta espécie, enquanto o restante

teve valores de $q1=0.946$ a 0.998 de seus genótipos atribuídos a esta classe parental (média de $q1=0.995$). Para o grupo de *P. corruscans* os valores de atribuição dos genótipos a esta espécie foram de $q2=0.924$ a 0.998 (média de $q2=0.995$). As populações com hibridação apresentaram genótipos atribuídos a ambas espécies, demonstrando sinais de introgressão, porém, sem constituir um grupo diferenciado (a atribuição de cada indivíduo das populações de Aquidauana e Mogi-Guaçu utilizando os oito *loci* encontra-se nas tabelas 5 e 6, respectivamente) (Figura 1).

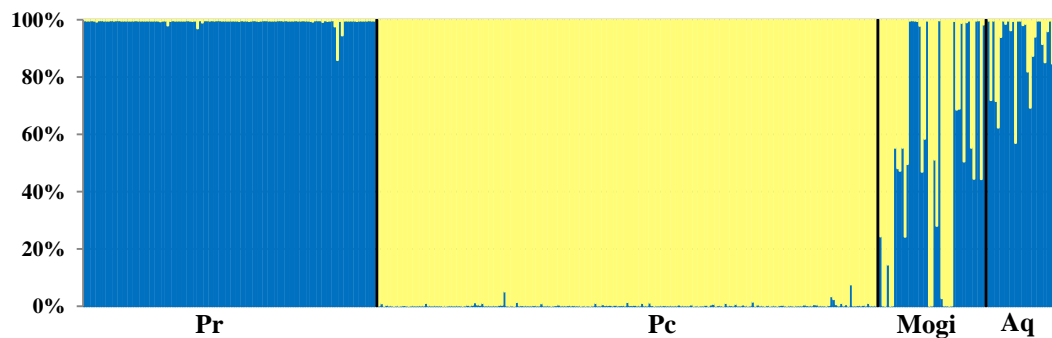


Figura 1. Estrutura “bar plot” das populações, estimada pelo programa Structure utilizando oito microssatélites. Cada cor indica um grupo com base em semelhanças genotípicas. $K=2$. Pr: populações de *P. reticulatum*, Pc: populações de *P. corruscans*, Mogi: população do rio Mogi-Guaçu, Aq: população do rio Aquidauana.

Identificação de híbridos e introgressão genética

As análises de diversidade demonstraram um número total de 58 alelos que variou de 4 a 12 alelos por *locus* no rio Aquidauana (Tabela 3). A H_e esteve entre 0.673 e 0.870, H_o entre 0.690 e 1.000 e o tamanho dos alelos entre 69 e 381 pb. Os valores de F_{is} foram negativos para 7 entre os oito *loci* analisados, e com excesso de heterozigotos significativo para Prt30, 36 e 39, que estavam fora do EHW ($P<0.006$ após a correção de Bonferroni) (Tabela 3). Desequilíbrio de ligamento foi verificado entre o *locus* Prt3 com Prt12, Prt30 e Prt39; entre Prt27 e Prt30 e Prt39; e entre Prt36 e Prt39 ($P<0.006$). No rio Mogi-Guaçu foram observados 123 alelos no total, com uma variação de 7 a 21 alelos por *locus*. A H_e variou de 0.704 até 0.947. O tamanho dos alelos esteve entre 69 e 432 pb (Tabela 3). Cinco *loci* apresentaram desvios do EHW ($P<0.006$). Neste local todos os *loci* demonstraram desequilíbrio de ligamento ($P<0.006$).

Tabela 3. Dados alélicos por *locus* para as populações dos rios Aquidauana e Mogi-Guaçu.

Lócus	N	A	Tamanho dos alelos (pb)	Ho	He	EHW	Fis
<i>Aquidauana</i>							
Prt3	30	4	159-195	0.800	0.693	0.668	-0.157
Prt5	28	7	248-278	0.821	0.786	0.007	-0.045
Prt12	30	6	272 – 308	0.800	0.673	0.376	-0.192
Prt25	30	5	169-183	0.900	0.708	0.218	-0.277
Prt27	29	7	211-271	0.690	0.707	0.033	0.025
Prt30	28	9	69-129	1.000	0.864	0.000*	-0.160
Prt36	25	12	232-381	0.960	0.870	0.002*	-0.106
Prt39	28	8	255-294	0.929	0.850	0.001*	-0.094
Média	28.5	7.25	-	0.862	0.769	0.163	-0.126
<i>Mogi-Guaçu</i>							
Prt3	41	7	159-197	0.683	0.704	0.353	0.030
Prt5	42	21	205-292	0.952	0.947	0.094	-0.006
Prt12	40	18	270-318	0.875	0.924	0.000*	0.054
Prt25	41	11	161-197	0.610	0.755	0.000*	0.194
Prt27	41	19	221-291	0.878	0.893	0.005*	0.016
Prt30	41	16	69-142	0.805	0.896	0.011	0.103
Prt36	39	20	232-432	0.795	0.911	0.002*	0.129
Prt39	42	11	261-297	0.619	0.876	0.000*	0.296
Média	40.9	15.37	-	0.777	0.863	0.058	0.102

Pr: *P. reticulatum*, *Pc*: *P. corruscans*, N: número de indivíduos genotipados, A: número total de alelos, Ar: riqueza alélica, pb: pares de bases, Ho: heterozigidade observada, He: heterozigidade esperada. EHW: testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Fis: coeficiente de endocruzamento. * $P < 0.006$ após a correção de Bonferroni.

Os testes realizados para testar a eficácia dos marcadores na identificação das espécies e os híbridos demonstraram que, utilizando o programa Structure, a atribuição das espécies parentais foi muito alta utilizando os oito microssatélites ($q=0.995$) e permitiu identificar a ocorrência de hibridação nas populações (Figura 1, Tabela 4). A utilização de todos os marcadores (oito microssatélites e três genes) aumentou a atribuição das classes parentais ($q=0.997$) e a detecção da hibridação, o que pôde ser visualizado pela maior atribuição da população de Aquidauana ao genótipo de *P. corruscans*. Por outro lado, a utilização apenas dos marcadores totalmente diagnósticos entre as espécies (microssatélites Prt3, 12, 30 e 36; e três genes), além de indicar os mesmos valores de atribuição observados utilizando todos os marcadores ($q=0.997$), intensificou a detecção da introgressão de genes em Aquidauana (Tabela 4).

Tabela 4. Atribuição média dos indivíduos de cada população aos genótipos das espécies parentais.

Pop	8 micros		8 micros, 3 genes		4 micros, 3 genes	
	q1	q2	q1	q2	q1	q2
Pr	0.995	0.005	0.997	0.003	0.997	0.003
Pc	0.995	0.005	0.003	0.997	0.003	0.997
Mogi	0.472	0.528	0.525	0.475	0.532	0.468
Aq	0.911	0.089	0.883	0.117	0.879	0.121

Pop: população, Pr: *P. reticulatum*, Pc: *P. corruscans*, Mogi: rio Mogi-Guaçu, Aq: rio Aquidauana, 8 micros: 8 loci microssatélite, 3 genes: marcadores dos genes conservados RAG2, EF1 e 18S, q1: genótipo atribuído à *P. reticulatum*, q2: genótipo atribuído à *P. corruscans*.

Na população de Aquidauana, o programa Structure indicou a presença de 13 indivíduos de *P. reticulatum* (3, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 22, 26 e 28) utilizando todas as combinações de marcadores (Tabela 5). Através deste mesmo programa, os oito microssatélites identificaram 18 *P. reticulatum* e 12 híbridos; com 11 marcadores (oito microssatélites e três genes) foram identificados 17 *P. reticulatum* e 13 híbridos; enquanto utilizando apenas os marcadores diagnósticos (quatro microssatélites e três genes) foram identificados 14 *P. reticulatum* e 16 híbridos (Tabela 6). O programa NewHybrids, aplicado para os genótipos com maior identificação dos híbridos (quatro microssatélites e três genes) classificou um híbrido F1, um F2 e todos os restantes como retrocruzamentos com *P. reticulatum* (R_{PR}). Além disso, identificou o indivíduo 15 como um híbrido avançado, o qual não havia sido identificado pelo Structure (Tabela 5).

No rio Mogi-Guaçu as análises no Structure revelaram dez indivíduos de *P. corruscans*, 11 de *P. reticulatum* e 18 híbridos através de todos os marcadores (Tabela 6). Porém, a análise com o programa NewHybrids demonstrou a presença de uma maior quantidade de híbridos, 21 no total (Tabela 6) e classificou quatro exemplares de R_{PC} , dez de R_{PR} , cinco F1 e dois F2 (Tabela 6).

Tabela 5. Identificação dos indivíduos do rio Aquidauana através de análises bayesianas no programa Structure e sua posterior classificação pelo NewHybrids.

Indiv.	3 genes*	<i>q</i> - Structure						<i>Q</i> - NewHybrids (classe)**
		8 micros.		8 micros. 3 genes		4 micros. 3 genes		
		<i>q1 Pr</i>	<i>q2 Pc</i>	<i>q1 Pr</i>	<i>q2 Pc</i>	<i>q1 Pr</i>	<i>q2 Pc</i>	
1	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.995	0.005	0.942 (Pr)
2	Pr	0.720	0.280	0.793	0.207	0.807	0.193	0.977 (R_{PR})
3	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.985 (Pr)
4	H_a (R_{PR})	0.717	0.283	0.725	0.275	0.758	0.242	0.977 (R_{PR})
5	H_a (R_{PR})	0.624	0.376	0.694	0.306	0.728	0.272	0.966 (R_{PR})
6	H_a (R_{PR})	0.940	0.060	0.778	0.222	0.705	0.295	0.969 (R_{PR})
7	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.989 (Pr)
8	H_a	0.986	0.014	0.939	0.061	0.881	0.119	0.993 (R_{PR})
9	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.978 (Pr)
10	Pr	0.964	0.036	0.926	0.074	0.997	0.003	0.985 (Pr)
11	Pr	0.996	0.004	0.994	0.006	0.997	0.003	0.965 (Pr)
12	F1	0.570	0.430	0.543	0.457	0.569	0.431	0.769 (F1)
13	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.989 (Pr)
14	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.989 (Pr)
15	H_a	0.981	0.019	0.924	0.076	0.979	0.021	0.666 (R_{PR})
16	Pr	0.986	0.014	0.988	0.012	0.997	0.003	0.965 (Pr)
17	H_a (R_{PR})	0.819	0.181	0.806	0.194	0.849	0.151	0.988 (R_{PR})
18	H_a	0.693	0.307	0.726	0.274	0.645	0.355	0.712 (F2)
19	Pr	0.874	0.126	0.916	0.084	0.853	0.147	0.548 (R_{PR})
20	H_a	0.941	0.059	0.839	0.161	0.877	0.123	0.988 (R_{PR})
21	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.989 (Pr)
22	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.989 (Pr)
23	H_a (R_{PR})	0.916	0.084	0.861	0.139	0.791	0.209	0.988 (R_{PR})
24	H_a	0.852	0.148	0.821	0.179	0.860	0.140	0.991 (R_{PR})
25	F1	0.960	0.040	0.758	0.242	0.649	0.351	0.956 (R_{PR})
26	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.992 (Pr)
27	H_a (R_{PR})	0.847	0.153	0.735	0.265	0.771	0.229	0.983 (R_{PR})
28	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.978 (Pr)
29	H_a	0.990	0.010	0.900	0.100	0.897	0.103	0.987 (R_{PR})
30	H_a (R_{PR})	0.989	0.011	0.836	0.164	0.805	0.195	0.988 (R_{PR})
Total***	15 Pr, 15 H	18Pr, 12H		17Pr, 13H		14 Pr, 16H		13 Pr, 17H

*Dados de Prado et al. (Capítulo 1) utilizando 3 genes RAG2, EF1 e 18S, micros.: microssatélites, **Análises utilizando 4 micros. e 3 genes, Pr: *P. reticulatum*, Pc: *P. corruscans*, H_A: híbrido avançado, F1: primeira geração híbrida, F2: segunda geração híbrida, R_{PR}, retrocruzamentos com *P. reticulatum*, R_{PC}: retrocruzamentos com *P. corruscans*. ***IC= 90% para o programa Structure. Em negrito e sublinhado os indivíduos identificados como híbridos.

Tabela 6. Identificação dos indivíduos do rio Mogi-Guaçu através de análises bayesianas no programa Structure e sua posterior classificação pelo NewHybrids.

Indiv.	3 genes*	q - Structure						Q - NewHybrids (classe)**
		8 micros.		8 micros. 3 genes*		4 micros. 3 genes		
		q1 Pr	q2 Pc	q1 Pr	q2 Pc	q1 Pr	q2 Pc	
1	<u>H_a</u>	0.244	0.756	0.170	0.830	0.139	0.861	0.953 (R_{PC})
2	Pc	0.003	0.997	0.002	0.998	0.003	0.997	0.997 (Pc)
3	Pc	0.002	0.998	0.002	0.998	0.003	0.997	0.996 (Pc)
4	<u>H_a</u>	0.146	0.854	0.187	0.813	0.136	0.864	0.951 (R_{PC})
5	Pc	0.002	0.998	0.002	0.998	0.003	0.997	0.996 (Pc)
6	Pc	0.003	0.997	0.002	0.998	0.003	0.997	0.996 (Pc)
7	<u>F1</u>	0.553	0.447	0.540	0.460	0.572	0.428	0.912 (R_{PR})
8	<u>F1</u>	0.482	0.518	0.487	0.513	0.503	0.497	0.946 (F1)
9	<u>F1</u>	0.473	0.527	0.478	0.522	0.503	0.497	0.946 (F1)
10	<u>F1</u>	0.553	0.447	0.537	0.463	0.498	0.502	0.900 (F1)
11	Pc	0.243	0.757	0.171	0.829	0.138	0.862	0.953 (R_{PC})
12	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.496	0.504	0.551	0.449	0.571	0.429	0.886 (R_{PR})
13	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.992 (Pr)
14	Pr	0.998	0.002	0.998	0.002	0.997	0.003	0.992 (Pr)
15	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.996	0.004	0.991 (Pr)
16	Pr	0.996	0.004	0.996	0.004	0.995	0.005	0.983 (Pr)
17	<u>H_a</u>	0.979	0.021	0.934	0.066	0.981	0.019	0.586 (R_{PR})
18	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.470	0.530	0.577	0.423	0.574	0.426	0.928 (F2)
19	<u>F1</u>	0.585	0.415	0.558	0.442	0.571	0.429	0.911 (R_{PR})
20	Pr	0.997	0.003	0.997	0.003	0.995	0.005	0.942 (Pr)
21	Pc	0.002	0.998	0.002	0.998	0.003	0.997	0.996 (Pc)
22	Pc	0.003	0.997	0.002	0.998	0.003	0.997	0.996 (Pc)
23	<u>F1</u>	0.512	0.488	0.504	0.496	0.503	0.497	0.899 (F1)
24	<u>H_a</u>	0.281	0.719	0.353	0.647	0.434	0.566	0.992 (F2)
25	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.998	0.002	0.989	0.011	0.972	0.028	0.693 (R_{PR})
26	Pc	0.028	0.972	0.024	0.976	0.063	0.937	0.831 (R_{PC})
27	Pc	0.003	0.997	0.002	0.998	0.003	0.997	0.997 (Pc)
28	Pc	0.003	0.997	0.002	0.998	0.003	0.997	0.993 (Pc)
29	Pc	0.002	0.998	0.002	0.998	0.003	0.997	0.993 (Pc)
30	Pc	0.003	0.997	0.002	0.998	0.003	0.997	0.996 (Pc)
31	Pr	0.996	0.004	0.997	0.003	0.996	0.004	0.970 (Pr)
32	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.687	0.313	0.724	0.276	0.719	0.281	0.977 (R_{PR})
33	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.690	0.310	0.722	0.278	0.721	0.279	0.977 (R_{PR})
34	Pr	0.989	0.011	0.992	0.008	0.997	0.003	0.992 (Pr)
35	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.505	0.495	0.555	0.445	0.626	0.374	0.930 (R_{PR})
36	Pr	0.992	0.008	0.996	0.004	0.995	0.005	0.942 (Pr)
37	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.992 (Pr)
38	<u>F1</u>	0.553	0.447	0.530	0.470	0.505	0.495	0.945 (F1)
39	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.445	0.555	0.509	0.491	0.572	0.428	0.886 (R_{PR})
40	Pr	0.997	0.003	0.998	0.002	0.997	0.003	0.992 (Pr)
41	Pr	0.998	0.002	0.998	0.002	0.997	0.003	0.992 (Pr)
42	<u>H_a (R_{PR})</u>	0.444	0.556	0.509	0.491	0.572	0.428	0.886 (R_{PR})
43	Pr	0.984	0.016	0.991	0.009	0.996	0.004	0.991 (Pr)
Total***	12 Pr, 12Pc, 19 H	14Pr, 11Pc, 18H		14 Pr, 11Pc, 18H		14 Pr, 11Pc, 18H		12 Pr, 10 Pc, 21H

*Dados de Prado et al. (Capítulo 1) utilizando 3 genes RAG2, EF1 e 18S, micros.: microssatélites. **Análises utilizando 4 micros. e 3 genes, Pr: *P. reticulatum*, Pc: *P. corruscans*, H_A: híbrido avançado, F1: primeira geração híbrida, F2: segunda geração híbrida, R_{PR}, retrocruzamentos com *P. reticulatum*, R_{PC}: retrocruzamentos com *P. corruscans*. ***IC= 90% para o programa Structure. Em negrito e sublinhado os indivíduos identificados como híbridos.

DISCUSSÃO

Análises interespecíficas

Um dos passos iniciais para o estabelecimento de marcadores microssatélites na identificação de espécies é determinar a diversidade alélica e a extensão da diferenciação entre os *taxa*, o que irá afetar a atribuição dos indivíduos (Roques et al., 1999). Este estudo revelou que a análise dos genótipos através de oito microssatélites foi eficiente discriminar as espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans*, com apenas 24 alelos compartilhados entre as espécies e quatro *loci* totalmente diagnósticos. Peixes do gênero *Sebastes* apresentaram 20% dos alelos compartilhados entre as espécies e os valores de F_{st} variaram entre 0.088 a 0.199 e R_{st} entre 0.120 e 0.486 (Roques et al., 1999). No presente estudo o R_{st} médio foi de 0.9008, aproximadamente 2,5 vezes maior que o F_{st} médio (0.35612), o que demonstra uma maior diferença entre os tamanhos alélicos quando comparado com as frequências alélicas. Apesar disto, análises bayesianas para identificar hibridação utilizam, além de diferenças fixas entre as espécies, como alelos exclusivos ou de tamanhos distintos, frequências alélicas como componente para verificar a divergência entre os indivíduos (Pritchard et al., 2000; Anderson e Thompson, 2002). Os valores de F_{st} foram altamente significativos para todos os *loci* neste trabalho, o que confirma a utilidade destes marcadores para os estudos de hibridação.

Roques et al. (1999) investigaram o potencial de microssatélites para distinguir diferentes espécies de peixes do gênero *Sebastes* e observaram que, apesar de não existirem alelos diagnósticos ou exclusivos entre as espécies, a diferenciação interespecífica foi na proporção de 10:1 (F_{st}) no que se refere a variação entre as espécies e entre as populações dentro de cada espécie. As análises de AMOVA neste trabalho indicaram uma variação altamente significativa entre as espécies (33,69%), aproximadamente na proporção de aproximadamente 17:1 quando comparada com a variação entre as populações de cada espécie (1,94%). Assim como o verificado por Roques et al. (1999), estes dados indicam que a acumulação de mutações contribuiu mais substancialmente para a diferenciação entre as espécies quando comparada com a diferenciação entre as populações dentro de cada espécie.

Diversos estudos tem utilizado microssatélites com eficácia para investigar a hibridação em estoques selvagens, demonstrando diferenças alélicas entre espécies próximas. Dubut et al. (2010) distinguiram espécies de Ciprinídeos através de análises bayesianas com uma atribuição correta de 97% a 99%, tanto utilizando 23 como 42 *loci*. Em outro estudo com

estas espécies, o F_{st} foi entre 0.5 e 0.16 utilizando cinco microssatélites (Demandt e Bergek, 2009). Uma análise da hibridação entre espécies de lobo e cão doméstico utilizando 15 microssatélites demonstrou valores médios de $F_{st}=0.05$ e $R_{st}=0.36$, enquanto as análises de atribuição pelo programa Structure demonstraram q médio de 0.8 (Khosravi et al., 2013). Um estudo com *P. corruscans*, utilizando microssatélites distintos dos utilizados neste trabalho (Revaldaves et al., 2005), demonstraram uma identificação eficiente entre esta espécie e *P. reticulatum*, com 98 e 89 % de atribuição correta dos *taxa*, respectivamente Carvalho et al. (2013).

Estes resultados, quando comparados com o observado neste estudo demonstram que os microssatélites aqui utilizados apresentaram uma alta diferenciação entre as espécies, o que foi confirmado através do programa Structure, que identificou 2 grupos distintos correspondentes à cada uma das espécies com 100% de atribuição correta de *P. corruscans* e apenas um entre os 202 indivíduos de *P. reticulatum* com atribuição menor que 95 % ao seu *taxa* (99.5 % de identificação correta).

Identificação de híbridos e introgressão genética

Além de marcadores moleculares que distingam espécies parentais e permitam a identificação de híbridos, dados genético-populacionais resultantes de genótipos multialélicos como os microssatélites podem demonstrar importantes características populacionais que indiquem hibridação no ambiente selvagem. Populações com ocorrência de introgressão genética podem apresentar um aumento da diversidade genética resultante da presença de novos alelos de duas espécies distintas, levando a um aumento de heterozigotos na população (Arnold e Martin, 2009). A população de Aquidauana, analisada neste estudo, apresentou uma maior diversidade quando comparada com a espécie *P. reticulatum*, e os valores de F_{is} foram negativos para sete entre os oito *loci* analisados, entre os quais, três apresentaram desvios significativos do EHW. Valores negativos de F_{is} indicam um excesso de heterozigotos (Wright, 1978), o que pode ser decorrente de hibridação introgressiva entre as espécies *P. reticulatum* e *P. corruscans* nesta localidade. Além disso, dados sugerem que quando o fluxo gênico e a introgressão não ocorreram por tempo suficiente para homogeneizar as diferenças entre os *loci*, pode resultar em um excesso de heterozigotos (Haas et al., 2009), como o verificado no rio Aquidauana, demonstrando que retrocruzamentos relativamente recentes podem ter ocorrido nesta população.

Na população de Mogi-Guaçu, a diversidade média entre todos os *loci* também foi maior do que o observado em ambas as espécies parentais, o que também pode ser resultado da mistura de alelos interespecíes e híbridos F1 heterozigotos na amostra. Apesar disto, o Fis médio indicou positivo. Os desvios do EHW e o excesso de homozigotos observados podem estar relacionados com a ocorrência de ambas as espécies parentais nesta localidade. Como estas espécies foram introduzidas neste rio (Meschiatti e Arcifa, 2009; Prado et al., Capítulo 1), é provável que sejam provenientes de cultivo e possuam alta endogamia e excesso de homozigotos.

Em relação ao tamanho dos alelos foi interessante verificar neste estudo que em ambas as populações com hibridação a variação do tamanho entre todos os *loci* abrangeu alelos das duas espécies parentais (A=69 a 381 pb no rio Aquidauana; 69 a 432 pb no rio Mogi-Guaçu) quando comparados com a variação de A=99 a 306 pb para *P. reticulatum* e 69 a 433 pb para *P. corruscans*. Estes dados confirmam a presença de híbridos nestes locais.

A distribuição de desequilíbrio de ligamento entre pares de *loci* (DL) é útil para descrever a distribuição dos genótipos híbridos e para estimar a "idade" da população hibridizada (Allendorf et al., 2010). Populações com ocorrência de hibridação recente irão apresentar DL para a maioria das associações entre os *loci*, uma vez que irá conter espécies parentais e muitos híbridos F1. Em contraste, os genótipos serão randomicamente associados entre os *loci* em populações com alta hibridação ("*hybrid swarms*") onde a introgressão tenha ocorrido por muitas gerações. Isto irá ocorrer rapidamente para *loci* não ligados fisicamente, pois o DL irá decair pela metade em cada geração (Allendorf et al., 2010). Neste estudo, DL foi verificado entre poucas combinações de *loci* no rio Aquidauana, o que indica que alguns microssatélites restauraram o equilíbrio após algumas gerações e a hibridação nesta população (apesar de recente o suficiente para não ter restaurado o equilíbrio de HW), possivelmente ocorreu há algumas gerações atrás. No rio Mogi, por outro lado, foram observados DL entre todas as combinações para todos os *loci*, resultante da presença de ambas as espécies parentais, híbridos F1 e retrocruzamentos neste rio, confirmados neste estudo e em trabalhos anteriores (Prado et al., Capítulo 1).

O programa Structure, em amostras com mistura genética, assumindo que $k=2$, isto é, duas populações parentais de referência, infere que existem duas populações (ou espécies) contribuindo para o *pool* gênico da amostra, e assume que cada indivíduo herdou uma fração do seu genoma (q) do genoma de seus ancestrais na população K (Pritchard et al., 2000; Sanz et al., 2009; Vähä e Primmer, 2006). Híbridos F1 podem ser identificados, por exemplo, por

serem intermediários em certo grau entre os dois clusters em termos do valor de q , isto é, provavelmente apresentarão $q=0.5$. Este programa permitiu identificar a maioria das amostras analisadas neste estudo. Em comparação com trabalho anterior utilizando três genes nucleares (Prado et al., Capítulo 1), os microssatélites identificaram todos os indivíduos no rio Mogi Guaçu e 12 entre 15 híbridos no rio Aquidauana, indicando uma alta eficácia.

Estudos simulados demonstram uma diferença significativa na detecção de híbridos de acordo com a presença ou não de introgressão genética avançada e de acordo com a frequência de híbridos na população. Em casos onde existem poucos híbridos F1 na amostra (1 %, por exemplo) e alta introgressão, pode ser muito difícil identificar os indivíduos, mesmo dispondo de diversos marcadores nucleares (Sanz et al., 2009; Vähä e Primmer, 2006). Como em ambas as populações analisadas neste trabalho ocorre introgressão, e especialmente em Aquidauana os níveis de introgressão são altos, teoricamente, todos os indivíduos podem corresponder a retrocruzamentos avançados com uma grande variação de genótipos, o que dificultou a identificação de alguns indivíduos.

Apesar disto, os resultados demonstram que os microssatélites aqui utilizados são extremamente úteis e informativos no estudo da hibridação neste grupo dos peixes. Além de diferenciar as espécies e híbridos, estes marcadores neutros disponibilizaram informações populacionais importantes, como valores de H_e , desvios do EHW e desequilíbrio de ligamento, que representam indicadores de desequilíbrios populacionais causados pela hibridação (Haas et al., 2009). Uma outra utilidade dos microssatélites é, além da detecção da hibridação, integrar análises de diversidade e estruturação genética, possibilitando uma análise mais completa e dinâmica das populações naturais (Dubut et al., 2010; Prado et al., *in press*). Além disso, microssatélites com diferenças bem estabelecidas entre as espécies, como os *loci* analisados neste estudo, podem ser úteis para identificar a origem de peixes selvagens e cultivados, monitorar escapes e realizar estudos de parentesco (Zhang et al., 2013), o que não seria possível através de marcadores sem variação intraindividual.

Testes dos marcadores para a identificação individual

Em casos de alta mistura genética entre as espécies, e quando é necessária maior acuracidade e certeza da identificação individual, como por exemplo, para a remoção dos híbridos em projetos de conservação ou manejo em aquicultura (Toledo-Filho et al., 1994;1998; Allendorf et al., 2010), ou em projetos de pesquisa onde não possam ser utilizados

híbridos, a identificação equivocada dos exemplares pode causar problemas. Neste trabalho, o uso de todos os microssatélites em conjunto com os genes diagnósticos (11 marcadores) foi eficaz, porém, não identificou alguns híbridos quando comparado com a utilização dos marcadores diagnósticos e teve resultados quase idênticos à utilização apenas dos microssatélites. Assim, a aplicação de todos estes marcadores seria um gasto de tempo e reagentes desnecessários. Já a utilização dos microssatélites diagnósticos (Prt3, 12, 30 e 36) e dos genes RAG2, EF1 e 18S parece ser a melhor opção para a identificação individual, que permitiu identificar uma maior quantidade de híbridos nas amostras. O programa NewHybrids foi muito importante, pois além de classificar os híbridos em sua maioria com alta probabilidade, identificou alguns híbridos não identificados pelo Structure. Quando comparado com Prado et al. (Capítulo 1), este programa permitiu classificar uma maior quantidade de híbridos avançados no rio Aquidauana, demonstrando que a introgressão genética é maior do que o esperado. Além disso, no rio Mogi-Guaçu foram identificados retrocruzamentos com a espécie *P. corruscans*, o que não havia sido relatado anteriormente.

Vähä e Primmer (2006) avaliaram a performance de métodos bayesianos para detectar híbridos F1 e retrocruzamentos utilizando diferentes níveis de divergência genética entre as espécies parentais (F_{st} = 0.03, 0.06, 0.12 ou 0.21) e aplicando vários números de *loci* microssatélites (6, 12, 24 ou 48). Os autores verificaram que o número de marcadores para detectar os indivíduos híbridos aumentou conforme os níveis de divergência entre as espécies diminuiu. Com relativa baixa diferenciação entre as espécies parentais (F_{st} = 0.03 a 0.06) os híbridos F1 puderam ser distinguidos com eficiência, porém um maior número de marcadores foi necessário. Roques et al (1999) demonstraram que utilizando de oito a dez *loci*, a atribuição variou de 87 a 100%, enquanto utilizando os quatro microssatélites com maiores diferenças entre as espécies, a atribuição geral foi de 95%.

Neste estudo, a utilização dos microssatélites diagnósticos e dos genes nucleares, por sua alta divergência entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*, demonstrou ser altamente eficaz para identificar os exemplares. Em análises com truta por exemplo, foram utilizados microssatélites para análises populacionais, porém, como existe hibridação entre espécimes de cultivo e selvagens, e o interesse é utilizar apenas indivíduos selvagens, os autores complementam as análises com o marcador nuclear diagnóstico "LDH-C*90" (Vilas et al., 2010).

No presente trabalho, todos os marcadores utilizados e testados permitiram a identificação dos híbridos entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*. As análises bayesianas

também foram eficientes para atribuir os indivíduos ao seu grupo correspondente, parental ou híbrido. Assim, a escolha de cada tipo ou combinação de marcadores nucleares vai depender do objetivo de cada estudo, da quantidade de introgressão nas populações a serem estudadas e disponibilidade de tempo, custo e reagentes. Em casos de análises genético populacionais os microssatélites aqui aplicados podem disponibilizar informações valiosas sobre a hibridação e introgressão genética. Quando os objetivos forem a identificação de peixes provenientes de cultivo, amostras comercializadas ou projetos de conservação que requeiram uma alta acuracidade de identificação individual, pode ser mais adequado a utilização dos microssatélites e genes diagnósticos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho disponibiliza uma gama de marcadores genéticos para serem aplicados em estudos genético populacionais e de hibridação em populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans*. Os marcadores dos genes nucleares EF1 e 18S consistiram em marcadores úteis para a identificação destas espécies e seus híbridos, sem variação intraespecífica. Já os 16 microssatélites desenvolvidos e caracterizados para a espécie *P. reticulatum*, com amplificação cruzada 100% eficaz em *P. corruscans*, e amplificados através de dois PCR-multiplex, permitiram obter a genotipagem destes *loci* nestas espécies de maneira rápida e eficaz.

Os estudos populacionais demonstraram importantes dados de diversidade e diferenciação genética nas populações de *P. reticulatum* e *P. corruscans*, além de diferentes cenários de diferenciação populacional entre as espécies, os quais podem estar relacionados à distintos comportamentos migratórios.

A avaliação genética da hibridação nas populações destas espécies demonstrou que possivelmente a hibridação natural entre estas espécies é rara. A presença de híbridos F1 e híbridos avançados foi observada em três rios, demonstrando que ocorre contaminação genética do ambiente selvagem, possivelmente devido à escapes e introduções de pisciculturas. Esta etapa do trabalho representou a primeira documentação de introgressão genética entre estas espécies em suas populações naturais.

Posteriormente, os microssatélites demonstraram alta divergência genética entre *P. reticulatum* e *P. corruscans*, tanto no tamanho como variação alélica, e foram eficientes para a identificação de híbridos e introgressão genética. Além disso, podem fornecer importantes dados genético-populacionais que indiquem a ocorrência de hibridação nas populações naturais, constituindo marcadores genéticos flexíveis para serem utilizados em estudos que integrem a obtenção de dados de diversidade, estruturação e hibridação. Os testes realizados também indicaram que a utilização dos microssatélites totalmente diagnósticos em conjunto com marcadores de genes nucleares pode ser a metodologia mais precisa na identificação individual.

Os dados deste estudo, relacionados com a hibridação, diversidade e estruturação genética destas espécies representam informações importantes para um futuro monitoramento genético das populações naturais, para a aplicação de metodologias genéticas na aquicultura e no estabelecimento de políticas de conservação das espécies parentais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J (2013) Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.*, 26(2):229–46.
- Aboim MA, Mavárez J, Bernatchez L, Coelho MM (2010) Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: a comparison between two independent hybrid zones. *J. Evol. Biol.*, 23(4):817–828.
- Abreu MM, Pereira LHG, Vila VB, Foresti F, Oliveira C (2009). Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genet. Mol. Biol.*, 32(4):868–73.
- Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G (2010) Genomics and the future of conservation genetics. *Nature*, 11(10):697–709.
- Allendorf FW, Leary RF (1988) Conservation and distribution of genetic variation in a polytypic species, the cutthroat trout. *Conserv. Biol.*, 2:170–184.
- Allendorf FW, Leary RF, Hitt NP, Knudsen KL, Lundquist LL, Spruell P (2004) Intercrosses and the U.S. Endangered Species Act: Should Hybridized Populations be Included as Westslope Cutthroat Trout? *Conserv. Biol.*, 18(5):1203–1213.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evolut.*, 16(11):613–622.
- Anderson E, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using *multilocus* genetic data. *Genetics*, 160:1217–1229.
- Arnold ML, Bulger MR, Burke JM, Hempel AL, Williams JH (1999) Natural Hybridization: How Low Can You Go and Still Be Important? *Ecology*, 80(2):371–381.
- Arnold ML, Hodges SA (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Tree*, 2:67–71.
- Arnold ML, Martin NH (2009) Adaptation by introgression. *J. Biol.*, 8:82.
- Avise JC (1986) Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. London*, 42:312–325.
- Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 11(2):155–65.
- Bartley DM, Rana K, Immink AJ (2001) The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10:325–337.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Mol. Ecol.*, 10:551–568.

- Batista JS, Alves-Gomes JA (2006) Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genet. Mol. Res.*, 5:723–740.
- Bettles CM, Docker MF, Dufour B, Heath DD (2005) Hybridization dynamics between sympatric species of trout: loss of reproductive isolation. *J. Evol. Biol.*, 18(5):1220–1233.
- Bignotto TS, Prioli AJ, Prioli SMAP, Maniglia TC, Boni TA, Lucio LC, Gomes RA et al. (2009) Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the parana river basin. *Braz. J. Biol.*, 69:681–689.
- Blohm D, Bonhomme F, Carvalho G, Crosetti D, Cross T, Dahle G, Danancher D et al. (2007) Assessment of tools for identifying the genetic origin of fish and monitoring their occurrence in the wild. *Genimpact*—Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network (EU contract no. RICA-CT-2005-022802). Final scientific report, July, 128–134.
- Boecklen WJ, Howard D.J. (1997) Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, 78:2611–2616.
- Bohling JH, Adams J R, Waits LP (2013) Evaluating the ability of Bayesian clustering methods to detect hybridization and introgression using an empirical red wolf data set. *Mol. Ecol.*, 22(1):74–86.
- Broughton R E, Vedala KC, Crowl TM, Ritterhouse LL (2011) Current and historical hybridization with differential introgression among three species of cyprinid fishes (genus *Cyprinella*). *Genetica*, 139(5):699–707.
- Buitrago-Suárez UA, Burr BM (2007) Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Blecker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512(1): 1-38.
- Campos JL (2010) O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos, In: Baldisserotto B, Gomes LC (Eds.) *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, pp. 335-361.

- Campton DE (1987) Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretations. In: Population Genetics and Fishery Management (Ryman, N. and Utter, F., eds), University of Washington Press, pp. 161–192.
- Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A (2003) Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. World Fisheries Trust/World Bank/ IDRC, Victoria.
- Carvalho DC, Oliveira DAA, Beheregaray LB, Torres RA (2012) Hidden genetic diversity and distinct evolutionarily significant *P. corruscans*. *Conserv. Genet.*, 13:1671–1675.
- Carvalho DC, Seerig AS, Brasil BSAF, Crepaldi DV, Oliveria DAA (2013). Molecular identification of the hybrid between the catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* using a set of eight microsatellite markers. *J. Fish. Biol.*, 83(3):671–6.
- Carvalho-Costa LF, Piorski NM, Willis SC, Galetti PM, Ortí G (2011) Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 59(1):177–94.
- Castellani D, Barrella W (2005) Caracterização da piscicultura na região do vale do Ribeira – SP. *Cienc. Agrotec.*, 29(1):168-176
- Cebrián RF (2011) Estrutura poblacional y demografía genética en poblaciones de trucha común (*Salmo trutta*) del Pirineo Catalán. Tese - doutorado. Universitat de Girona, Espanha.
- Ciofi C, Tzika AC, Natali C, Watts PC, Sulandari S, Zein MSA, Milinkovitch MC (2011) Development of a multiplex PCR assay for fine-scale population genetic analysis of the Komodo monitor *Varanus komodoensis* based on 18 polymorphic microsatellite *loci*. *Mol. Ecol. Res.*, 11(3):550–556.
- Crepaldi DV, Faria PMC, Teixeira EDA, Ribeiro LP et al. (2007). O surubim na aquacultura do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 30(3/4):150–158.
- Cunha DB, Sodr e D, Santos ACA, Schneider H, Sampaio I, Sequeira F, Vallinoto M (2012) A rapid method for species identification and interspecies introgression based on a PCR–RFLP: application to the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* (Anura: Bufonidae). *Conserv. Genet. Res.*, 5(1):227–229.
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93:504–509.
- Demandt MH, Bergek S (2009) Identification of cyprinid hybrids by using geometric morphometrics and microsatellites. *J. Appl. Ichthyol.*, 25(6):695–701.

- DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.*, 56:461-473.
- Dubut V, Sinama M, Martin JF, Megléc E, Fernandez J, Chappaz R, Gilles A (2010) Cross-species amplification of 41 microsatellites in European cyprinids: A tool for evolutionary, population genetics and hybridization studies. *BMC Res. Notes*, 3:135-143.
- Epifanio J, Philipp D (2001) Simulating the extinction of parental lineages from introgressive hybridization: the effects of fitness, initial proportions of parental taxa, and mate choice. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 10:339-354.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) *ARLEQUIN* ver. 3. 0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics*, 1:47–50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479–491.
- Fernandes R, Gomes LC, Agostinho AA (2003) Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? *Acta Sci.: Biol. Sci.*, 25(1):115-120.
- Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes) and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 141 8:1-628.
- Ferreira M, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA – CENARGEM, 3ª edição, Brasília (DF), 220p.
- Fitzpatrick BM (2012) Estimating ancestry and heterozygosity of hybrids using molecular markers. *BMC Evol. Biol.*, 12(1):131-137.
- Frankel OH, Soule ME (1981) Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, UK, 607 pp.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 262 pp.
- García de León FJ; Chikhi L, Bonhomme F (1997) Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Mol. Ecol.*, 6:51-62

- Glover KA, Quintela M, Wennevik V, Besnier F, Sorvik AGE, Skaala O (2012) Three decades of farmed escapees in the wild: a spatio-temporal analysis of Atlantic salmon population genetic structure throughout Norway. *PloS one*, 7(8).
- Godinho AL, Kynard B, Godinho HP (2007) Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environ. Biol. Fish.*, 80:421–433.
- Godinho HP, Gomes LC, Fernandez DR, Suzuki HI (2002) Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. *River Res. Appl.*, 18(3): 299-306.
- Godinho HP (2007) Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, 31(3):351-360.
- Goodman M, Pedwaydon J, Czeluzniak J, Suzuki T, Gotoh T, Moens L, Shishikura F et al. (1988) An evolutionary tree for invertebrate globin sequences. *J. Mol. Evol.*, 27:236–249.
- Goodman SJ (1997) RST CALC: a collection of computer programs for calculating unbiased estimates of genetic differentiation and determining their significance for microsatellite data. *Mol. Ecol.*, 6:881-885.
- Goudet J (2002) *FSTAT*, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/Fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Gunnel K, Tada MK, Hawthorne FA, Keeley ER, Ptacek MB (2008). Geographic patterns of introgressive hybridization between native Yellowstone cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkia bouvieri*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*) in the South Fork of the Snake River watershed, Idaho. *Conserv. Genet.*, 9:49–64.
- Haas F, Pointer MA, Saino N, Brodin A, Mundy NI, Hansson B (2009) An analysis of population genetic differentiation and genotype-phenotype association across the hybrid zone of carrion and hooded crows using microsatellites and MC1R. *Mol. Ecol.*, 18(2):294–305.
- 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.
- Hansen MM, Kenchington E, Nielsen EE (2001) Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish Fish.*, 2:93–112.

- Hashimoto DT, Ferguson-Smith MA, Rens W, Prado FD, Foresti F, Porto-Foresti F (2013b) Cytogenetic Mapping of H1 Histone and Ribosomal RNA Genes in Hybrids between Catfish Species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogenet. Gen. Res.*, 139:102–106.
- Hashimoto DT, Laudicina A, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2009) Chromosomal features of nucleolar dominance in hybrids between the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Genetica*, 137:135–140.
- Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Bortolozzi J, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F (2010). Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture*, 298(3-4): 346–349.
- Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F (2011a) Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture*, 321(1-2): 49–53.
- Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2011b) Marcadores de DNA no monitoramento genético de híbridos interespecíficos de peixes. *Panorama da Aquicultura*, setembro/outubro:48-53.
- Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2013a) Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. *Aquacult. Res.*, 44(6):876-884.
- Hitt NP, Frissell CA, Muhlfeld CC, Allendorf FW (2003) Spread of hybridization between native westslope cutthroat trout, *Oncorhynchus clarkii lewisi*, and nonnative rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 60:1440–1451.
- Hubbs CL (1955) Hybridization between Fish Species in Nature, 4(1): 1–20.
- Huxel GR (1999) Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biol. Cons.*, 89(2):143–152.
- IBAMA (2007) Estatística da pesca Brasil – grandes regiões e unidades da federação. 113 pg.
- Jolly MT, Maitland PS, Genner MJ (2011) Genetic monitoring of two decades of hybridization between allis shad (*Alosa alosa*) and twaite shad (*Alosa fallax*). *Conserv. Genet.*, 12(4):1087–1100.

- Kang JH, Kim YK, Park JY, An CM, Nam MM, Byun SG, Lee BI (2011) Microsatellite analysis as a tool for discriminating an interfamily hybrid between olive flounder and starry flounder. *Genet. Mol. Biol.*, 10(4):2786–2794.
- Khosravi R, Rezaei HR, Kaboli M (2013) Detecting hybridization between Iranian wild wolf (*Canis lupus pallipes*) and free-ranging domestic dog (*Canis familiaris*) by analysis of microsatellite markers. *Zool. Sci.*, 30(1):27–34.
- Laikre L, Antunes A, Alexandrino P (1999) Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. In: Laikre L et al (eds) “Troutconcert”: EU Fair CT97–3882. Stockholm University, Sweden.
- Laikre L, Palm S, Ryman N (2005) Genetic population Structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio*, 34:11-119.
- Lamer JT, Dolan CR, Petersen JL, Chick JH, Epifanio JM (2010) Introgressive Hybridization between Bighead Carp and Silver Carp in the Mississippi and Illinois Rivers. *N. Am. J. Fish. Manage.*, 30(6):1452–1461.
- Leary RF, Gould WR, Sage GK (1996) Success of basibranchial teeth in indicating pure populations of rainbow trout and failure to indicate pure populations of westslope cutthroat trout. *N. Am. J. Fish. Manage.*, 16:210–213.
- Lundberg JG, Littmann MW (2003) Family Pimelodidae. In: Reis, R. E.; Kullander SO, Ferraris-JR CJ (Org) Check List of the freshwater fishes of South and Central America, Porto Alegre, pp 432–446
- Machado-Schiaffino G, Juanes F, Garcia-Vazquez E (2010) Introgressive hybridization in North American hakes after secondary contact. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 55(2):552–558.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evolut.*, 20(5):229–237.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133):279–283.
- Manel S, Gaggiotti O, Waples RS (2005) Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends Ecol. Evolut.*, 20:135–142.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Baden JS, Bembien LA, Berka J et al (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057):376–380.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, 7:639–655.

- Mateus LAF, Penha JMF (2007). Dinâmica populacional de quatro espécies de grandes bagres na bacia do rio Cuiabá, Pantanal norte, Brasil (Siluriformes, Pimelodidae). *Rev. Bras. Zool.*, 24(1):87–98.
- Mayr E (1963) The breakdown of isolating mechanisms (hybridisation), In: Mayr E (Ed.). *Animal species and evolution*. Belknap Press, Cambridge, MA, pp. 110-135.
- Mello PH, Venturieri RLL, Honji RM, Moreira RG (2009). Threatened fishes of the world: *Pseudoplatystomacorruscans* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae). *Env. Biol. Fish.*, 85(4):359–360.
- Meschiatti AJ, Arcifa MS (2009) A review on the fishfauna of Mogi-Guaçu River basin: a century of studies. *Acta Limn. Bras.* 21 (1):135–159.
- Metcalf JL, Siegle MR, Martin AP (2008) Hybridization dynamics between Colorado's native cutthroat trout and introduced rainbow trout. *J. Hered.*, 99(2):149–156.
- Ministério da Pesca e Aquicultura (2010) Boletim estatístico da pesca e aquicultura, MPA, Brasil.
- Moritz C (1994) Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends Ecol. Evolut.*, 9:373-375.
- Moritz C, Dowling TE, 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, Krajewski C (2004) Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zool. J. Linn. Soc.*, 140:551–575.
- Muhlfeld CC, Clint C, McMahon TE, Belcer D, Kershner JL (2009) Spatial and temporal spawning dynamics of native westslope cutthroat trout, *Oncorhynchus clarkii lewisi*, introduced rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and their hybrids. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.* 66 (7):1153-1168.
- Muhlfeld CC, Kalinowski ST, McMahon TE, Taper ML, Painter S, Leary RF, Allendorf FW (2010) Hybridization rapidly reduces fitness of a native trout in the wild. *Biol. Letters*, 5(3):328–331.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish. Physiol. Biochem.* 35(1):81–100.
- Orsi LM, Agostinho AA (1999) Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, 16 (2):557-560.

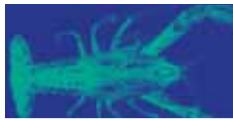
- Ostberg CO, Rodriguez RJ (2004) Bi-parentally inherited species-specific markers identify hybridization between rainbow trout and cutthroat trout subspecies. *Mol. Ecol. Notes*, 4(1):26–29.
- Ostberg CO, Rodriguez RJ (2004) Bi-parentally inherited species-specific markers identify hybridization between rainbow trout and cutthroat trout subspecies. *Mol. Ecol. Notes*, 4(1):26–29.
- 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, pp.205–247.
- Pereira LH, Foresti F, Oliveira C (2009) Genetic Structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecol. Fresh. Fish.*, 18:215-225.
- Piorski NM, Sanches A, Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Carrillo-Avila M, Freitas PD, Galetti PM (2008). Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Braz. J. Biol.*,68(4 Suppl):1039–50.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F (2013) Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. *J. Appl. Ichthyol.*, doi:10.1111/jai.12092.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F (2010) Híbridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. In: Baldisserotto B and Gomes LC (orgs), UFMS (ed), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. pp.589-606.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F (2011) A híbridaç o interespecífica em peixes. *Panorama da Aquicultura*, julho/agosto: 28-33.
- Prado FD, Hashimoto DT, Mendonça FF, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2011) Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquacult. Res.* 42,1890-1894.
- Prado FD, Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012a) Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *J. Fish. Res.*, 125-126:300–305.
- Prado FD, Nunes TL, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2012b) Cytogenetic characterization of F₁, F₂ and backcross hybrids of Neotropical catfish

- species *Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes). Genet. Mol. Biol., 35 (1):57-64.
- Prado FD, Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F(2011b) Híbridos interespecíficos de peixes em ambientes naturais. Panorama da Aquicultura, novembro/dezembro:30-41.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population Structure using multilocus genotype data. Genetics, 155 (2):945–59.
- Raymond M, Rousset F (1995) *GENEPOP* (ver. 3.3): a population genetics software for exact test and ecumenicism. J Hered, 86:248–249.
- Resende EK (2003) Migratory fishes of the Paraguay - Paraná Basin excluding the Upper Paraná Basin. In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C and Baer A (eds) Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status. World Fisheries Trust, Victoria, pp 99-156.
- Resende EK, Catella AC, Nascimento FL, Palmeiras SS, Pereira RAC, Lima MS, Almeida VLL (1996) Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul. Corumbá, MS: EMBRAPA – CPAP, Boletim de Pesquisa 02, Mato Grosso do Sul.
- Resende EK, Catella AC, Nascimento FL, Palmeiras SS, Pereira RAC, Lima MS, Almeida VLL (1996) Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul. Corumbá, MS: EMBRAPA – CPAP, Boletim de Pesquisa 02, Mato Grosso do Sul.
- Revaldaves E, Pereira LHG, Foresti F, Oliveira C (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. Mol. Ecol. Notes, 5(3): 463–465.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridisation and introgression. Annual Rev. Ecol. Evol. Syst., 27:83-109.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43:223-225.
- Roques S, Duchesne P, Bernatchez L (1999) Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. Mol. Ecol., 8(10):1703–1717.

- Rousset F (1996) Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, 142:1357-1362.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) *primer 3*. Disponível em: [http:// www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html). In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds Krawetz S, Misener S), Humana Press, Totowa, NJ. USA., pp. 365–386.
- Rubidge E, Corbett P, Taylor EB (2001) A molecular analysis of hybridisation between native westslope cutthroat trout and introduced rainbow trout in southeastern British Columbia, Canada. *J. Fish Biol.*, 59 (Suppl. A):42-54.
- Rubidge EM, Taylor EB (2004) Hybrid zone structure and the potential role of selection in hybridizing populations of native westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) and introduced rainbow trout (*O. mykiss*). *Mol. Ecol.*, **13**:3735–3749.
- Sanz N, Araguas RM, Fernández R, Vera M, García-Marín JL (2009) Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Cons. Genet.*, 10(1):225–236.
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol. Evolut.*, 22(1):25–33.
- Scribner KT, Page KS, Bartron ML (2001) Hybridisation in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 293-323.
- Smith PF, Konings A, Kornfield I (2003) Hybrid origin of a cichlid population in Lake Malawi: implications for genetic variation and species diversity. *Molecular Ecology*, 12(9):2497–2504.
- Storfer A, Mech SG, Reudink MW, Lew K (2013) Inbreeding and strong population subdivision in an endangered salamander. *Cons. Genet.*, doi:10.1007/s10592-013-0526-3.
- Suplicy FM (2007) Freshwater fish seed resources in Brazil, in: Bondad-Reantaso M.G. (Ed.) *Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper, 501. FAO, Rome, pp.129-143.
- Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 19:265-293.
- Templeton AR (2011) *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, 705 p.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibron TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting. Position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673–4680.
- Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Bernardino G, 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, Bernardino G (1998) Programas Genéticos de Seleção, Hibridação e Endocruzamento Aplicados à Piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética 4*. CCS/USP, São Paulo, 56 pp.
- Tomoko O (1983) On the Evolution of Multigene Families. *Theor. Popul. Biol.*, 23(2):216–240.
- Torrice JP, Hubert N, Desmarais E, Duponchelle F, Nuñez Rodriguez J, Montoya-Burgos, Davila CG et al. (2009) Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 51(3):588–94.
- Vähä JP, Primmer C (2006) Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of *loci*. *Mol. Ecol.*, 15:63–72.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) *Micro-checker*: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, 4:535–538.
- Vargas-Ramírez M, Stuckas H, Castaño-Mora OV, Fritz U (2011) Extremely low genetic diversity and weak population differentiation in the endangered Colombian river turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines: Podocnemididae). *Cons. Genet.*, 13(1):65–77.
- Vera M, Sourinejad I, Bouza C, Vilas R, Pino-Querido A, Kalbassi MR, Martínez P (2011) Phylogeography, genetic Structure, and conservation of the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877), from Iran. *Hydrobiologia*, 664(1):51–67.
- Vilas R, Bouza C, Castro J, López A, Martínez P (2010) Management units of brown trout from Galicia (NW: Spain) based on spatial genetic structure analysis. *Conserv. Genet.*, 11(3):897–906.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31:3688–3691.

- Waples RS (1991) Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., the definition of “species” under the Endangered Species. Act. Mar. Fisheries Rev., 53:11–22.
- Willis S C, Macrander J, Farias I P, Ortí G (2012). Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *Cichla*) using multi-locus data. BMC Evol. Biol., 12:96.
- Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations. University of Chicago Press: Chicago. USA
- You C, Yu X, Tong J (2009) Detection of hybridization between two loach species (*Paramisgurnus dabryanus* and *Misgurnus anguillicaudatus*) in wild populations. Env. Biol. Fish., 86(1):65–71.
- Zhang Z, Glove KA, Wennevik V, Svasand T, Sorvik AGE, Fiske P, Karlsson S (2013) Genetic analysis of Atlantic salmon captured in a netting station reveals multiple escapement events from commercial fish farms. Fish. Manag. Ecol., 20(1):42–5.



Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture

Diogo Teruo Hashimoto¹, Fernanda Dotti do Prado¹, José Augusto Senhorini², Fausto Foresti³ & Fábio Porto-Foresti¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Bauru, Bauru, Brazil

²Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, CEPTA/ICMBio, Pirassununga, Brazil

³Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brazil

Correspondence: F Porto-Foresti, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), CEP 17033-360, Bauru, SP, Brazil. E-mail: fpforesti@fc.unesp.br

Abstract

Herein, we have developed molecular markers for nuclear genes to use in multiplex-PCR and PCR-RFLP, with the goal of characterising hybrid lines derived from crosses between pintado *Pseudoplatystoma corruscans* and cachara *P. reticulatum*. These markers, together with others described previously, were used to perform molecular identification analyses as genetic subsidies for Brazilian aquaculture. These analyses were performed due to the problems of high mortality in the offspring reported by the aquaculturist. From a total of 16 broodstock samples, 13 were genetically identified as hybrids; surprisingly, nine of these hybrids were found to be post-F1 lineages. These data show that the fertility of these animals can seriously affect the cultivated stocks, thus causing financial damage in this aquaculture system. The establishment of PCR-RFLP and multiplex-PCR as molecular techniques allows for both the correct management of these animals and the routine monitoring of production and trade of fish hybrids in aquaculture. Consequently, such tools will enable a sustainable development in the aquaculture industry.

Keywords: genetic identification, sustainable development, hybridization, *Pseudoplatystoma*

Introduction

Pimelodid species are currently placed among 30 genera and are endemic to the neotropics

(Lundberg & Littmann 2003). *Pseudoplatystoma* is one of the more economically important groups of the family Pimelodidae. Due to their flesh quality, large size and significance in sport fishing and historical fishery production in their regions of occurrence, species of *Pseudoplatystoma* are important resources for Brazilian aquaculture (Campos 2010).

The hybrids generated by crosses between pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz) and cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann & Eigenmann, popularly known as 'Ponto-e-vírgula' or 'Cachapinta', are the fish most often produced by several producers who work with juveniles of these species; the pure species are rarely commercialized (Campos 2010). The hybrids exhibit better growth performance than the pure species (Crepaldi, Faria, Teixeira, Ribeiro, Costa, Melo, Cintra, Prado, Costa, Drumond, Lopes & Moraes 2006). However, there is an enormous lack of information about trade and production of these fish, and the majority of juveniles commercialized in Brazil as pintado (*P. corruscans*) actually correspond to hybrid products. In addition, these hybrids are fertile and can backcross with their parental species (J. A. Senhorini, pers. comm.), which demonstrates that the marketing and management of the 'Ponto-e-vírgula' hybrids should receive special attention, mainly due to the threat that they pose to the cultivated stocks and because they are sold commercially as parental species.

Therefore, the methods of identification of these interspecific hybrids should be routinely employed

in Brazil; this will allow for proper monitoring and management in aquaculture. Several studies identify fish hybrids based on morphological or meristic characteristics without any inference from genetic markers (Scribner, Page & Bartron 2001). The identification of hybrids obtained through the external morphology is considered unreliable when it is used as the only source for analysis (Chevassus 1983; Mallet 2005), particularly for estimating introgression events that should be assessed via examination of multiple loci (Boecklen & Howard 1997).

Interest in the genetic identification of interspecific hybrids combined with recent advances in molecular technology has provided a considerable variety of genetic markers, which allow for the correct identification of hybrids (Scribner *et al.* 2001). The techniques of polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and multiplex-PCR are efficient methodologies that can be quickly and inexpensively executed and would allow for diagnoses based upon single nucleotide variations (Hashimoto, Mendonça, Senhorini, Bortolozzi, Oliveira, Foresti & Porto-Foresti 2010). Recently, using these methodologies, molecular markers based on the mitochondrial gene 16S and the nuclear gene RAG2 (*recombination activating gene 2*) were developed for the identification of hybrids between *P. corruscans* and *P. reticulatum* (Prado, Hashimoto, Mendonça, Senhorini, Foresti & Porto-Foresti 2011).

According to Prado *et al.* (2011), it is not possible to diagnose post-F1 lineages involving these hybrids, because only one nuclear marker (RAG2 gene) was established. For the identification of post-F1 hybrids with statistical confidence, at least four nuclear markers are required (Boecklen & Howard 1997; Docker, Dale & Heath 2003). Thus, we describe PCR-RFLP and multiplex-PCR protocols here to differentiate between the neotropical species *P. corruscans* and *P. reticulatum* and to add new nuclear markers for the identification of hybrids, especially post-F1 lineages. We have utilized these methods to demonstrate the efficiency of genetic markers for the evaluation of genetic integrity in a broodstock from a Brazilian fish farm and to report the uncontrolled management of fish hybrids in the aquaculture industry.

Materials and methods

To characterize molecular markers for the parental lineages, 20 specimens of *P. corruscans* and 20

specimens of *P. reticulatum* were genetically analysed. For the interspecific hybrid lines, we analysed 30 specimens of ‘Pintachara’ (crosses using *P. corruscans* as females and *P. reticulatum* as males) and 30 specimens of ‘Cachapinta’ (crosses using *P. reticulatum* as females and *P. corruscans* as males). All samples were obtained from the stocks maintained at the CEPTA/ICMBio (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Pirassununga, São Paulo State, Brazil), where the hybrids were produced. The fish specimens used in this study were identified and stored in the collection of the Laboratory of Fish Genetics, UNESP, Bauru (São Paulo State), Brazil.

To perform the analysis of molecular identification in a broodstock belonging to an important Brazilian fish farm, we collected biological samples (fin fragments) from 16 individuals. According to the personal classification of the fish farmer, the samples were identified morphologically as cachara (*P. reticulatum*), pintado (*P. corruscans*) and hybrids, which were derived from crosses between these two species. These analyses were performed due to problems with high mortality and low viability in the offspring, as well as difficulty in spawning the broodstock, according to reports of the producer. These problems were initially attributed to the genetic integrity of the broodstock, and we raised the issue that the breeding stock may be composed of hybrid lines. The animals were marked with tags (magnetic markers) and maintained by fish farming. When necessary, these animals were identified with reader equipment, which provided a means by which the aquaculturist could identify the ideal crosses.

Characterisation of the molecular markers

Sequences of nuclear genes encoding *elongation factor 1-alpha* (EF1 α), *β -globin* (GLOB) and *ribosomal RNA 18S* (rRNA 18S) (GenBank accession numbers JF834080 to JF834109) were obtained using the primer pairs described in the Table 1. The application of the rRNA 18S gene can have some limitations for species identification, because this gene family shows a complex organization with the presence of paralogous copies in the genome of some species (Carranza, Baguña & Riutort 1999; Barthélémy, Grino, Pontarotti, Casanova & Faure 2007). However, we did not detect rDNA 18S variants or alleles within the same species,

Table 1 Sequences of the primers and sizes of the PCR products or restriction fragments

Method	Gene	Primer (5' to 3')	Fragment size (bp)	
			<i>Pr</i>	<i>Pc</i>
PCR-RFLP	GLOB	<u>GLOB SiluF (TCAATATGGTTCCTACTGGACAGA)</u> <u>GLOB SiluR (CCAAGAAGCTGAAAGTAGACAGT)</u>	569	186 and 381
	EF1 α	<u>EF1α F (ATTGGAAGCTGACCTGTGG)</u> <u>EF1α R (CAGCCTTCTGTGCAGACTT)</u>	240, 270 and 290	240 and 560
	18S	[†] <u>18S NS1 (GTAGTCATATGCTTGCTCTC)</u> <u>18S SiluR (CCATCGAAAAGTTGATAGGG)</u>	350	163 and 187
Multiplex-PCR	GLOB	GLOB PcR (CAGCCACCTTGGGGTTTCT) GLOB PrF (GGTACGTCTAATCTCAGTAATTGAAA)	569 and 137	569 and 304
	EF1 α	EF1α PcR (CAACAATGGCAGCATCTCCT) EF1α PrR (ATAAAGGACAAGGACAAGATCG)	800 and 630	800 and 520

*Moyer, Burr and Krajewski (2004).

[†]White, Bruns, Lee and Taylor (1990).

Underlined, primers used for initial amplification and sequencing; Bold, primers used for multiplex-PCR; *Pc*, *Pseudoplatystoma corruscans*; *Pr*, *Pseudoplatystoma reticulatum*.

allowing the precise identification of the *Pseudoplatystoma* species.

Amplifications were performed using PCR in a total volume of 25 μ L with 200 μ M of each dNTP (dATP, dTTP, dGTP and dCTP), 1.5 mM MgCl₂, 1 \times Taq DNA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4 and 50 mM KCl), 0.5 units of Taq Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, São Paulo, Brazil), 0.1 μ M of each universal primer and 10–50 ng of genomic DNA. The reactions were performed for 35 cycles under the following conditions: for EF1 α , 30 s at 95°C, 30 s at 58°C and 45 s at 72°C; for GLOB, 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C; and for rRNA 18S, 30 s at 95°C, 30 s at 50°C and 10 s at 72°C. DNA sequences were analysed on an ABI Prism™ 3730 DNA Analyser using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, São Paulo, Brazil). The gene sequences from five individuals of each parental species were sequenced twice on both strands and aligned using ClustalW (Thompson, Higgins & Gibson 1994). The Kimura 2-parameter distance was estimated using MEGA software, version 4.0 (Tamura, Dudley, Nei & Kumar 2007).

To identify interspecific hybrids routinely in the Brazilian aquaculture, we established two types of molecular markers, PCR-RFLP and PCR-Multiplex, which are considered reliable and straightforward techniques to detect hybridization events (Hashimoto, Mendonça, Senhorini, Oliveira, Foresti & Porto-Foresti 2011). In the method of PCR-RFLP, the strategy is developing restriction maps for the

identification of enzymes capable of producing species-specific cuts, and thus generating diagnostic cleavage patterns. In multiplex-PCR, species-specific primers need to be designed nested within the universal primers to produce fragments of different sizes for each species in the multiplex reactions.

Restriction maps were analysed using NEBcutter software, version 2.0 (Vincze, Posfai & Roberts 2003). PCR products were digested via restriction enzymes in a final volume of 8 μ L containing 4 μ L of the PCR product, 1 \times enzyme buffer and 5 U of restriction enzyme (10 U μ L⁻¹) (New England Biolabs, Uniscience, São Paulo, Brazil). Reactions were incubated at the ideal temperature of each enzyme for 1 h.

Primer conditions were analysed using NetPrimer software, which is available at the PREMIER Biosoft International site <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>>. Primers were selected on polymorphic sites between the parental species and in the presence of mutations located at the 3' end of the annealing site, as it is based on the principle that the Taq polymerase has 5' to 3' exonuclease activity, and therefore, the mismatch between the 3' end of the primer and the DNA template results in the difficulty of amplification (Rychlik 1995). DNA fragment sizes were determined by electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide (1 ng mL⁻¹) and visualized under UV illumination. Images were captured using a digital camera (Olympus CAME-DIA C-5060, 5.1 Megapixel, São Paulo, Brazil).

Molecular identification of the breeding stock

For the purpose of evaluating the genetic integrity of the breeding stock, sample identification was initially performed using multiplex-PCR with the genes defined in this study together with markers for the mitochondrial 16S and nuclear RAG2 genes (Prado *et al.* 2011). Subsequently, to confirm the results, we performed PCR-RFLP analyses with the same genes. In all of the multiplex-PCR and PCR-RFLP assays performed at this stage of analysis, we used DNA samples from the pure parental species as controls for reaction specificity.

Using four nuclear loci as diagnostic tool for the molecular differentiation of backcrossed individuals (F1 × Parental), the probability of correct identification of animals belonging to post-F1 lineages is 87.5%. On the other hand, in intercrosses between F1 hybrid lines (F1 × F1), the probability of identification is approximately 93% (Toledo-Filho, Almeida-Toledo, Foresti, Bernardino & Calcagnotto 1994). Therefore, the use of four nuclear genes (RAG2, EF1 α , GLOB and 18S) together with mtDNA marker provides a reliable approach for the identification of post-F1 individuals, as proposed by other studies (Boecklen & Howard 1997; Docker *et al.* 2003).

According to criteria used by previous studies developed in trout (Docker *et al.* 2003), we classified the specimens into the following four classes: pure *P. corruscans*, pure *P. reticulatum*, first generation cross (F1) and post-F1 backcross. Specimens that were homozygous at all five markers for the same species were considered pure. Individuals were designated as F1 if they were heterozygous at every nuclear locus regardless of the mitochondrial pattern. Finally, samples that were not F1 crosses, but had at least one allele from each parental species, were grouped into the category of post-F1 backcross.

Results

PCR-RFLP and multiplex-PCR characterisation

Data obtained by sequencing allowed for the analysis of 743 bp of EF1 α (four polymorphic sites), 569 bp of GLOB (eight polymorphic sites) and 350 bp of 18S (two polymorphic sites), with a genetic distance of 0.005, 0.014 and 0.006 respectively. Intraspecific variability was not

detected for the analysed loci, demonstrating that both genes were conserved.

After restriction maps analysis, to standardize the methodology of PCR-RFLP, we used the enzyme HpyAV, which cleaves only in the GLOB gene segment of *P. corruscans*. For the enzymatic digestion of the EF1 α gene, we utilized the enzyme BpmI, which cleaves once in EF1 α of *P. corruscans* and twice in EF1 α of *P. reticulatum*. Finally, for RFLP analysis of the 18S gene, we selected the enzyme SmaI because its restriction site is restricted to the 18S gene of *P. corruscans*. In the three analysed genes, after digestion of the PCR products by the selected enzymes, the results of the electrophoresis revealed distinct profiles of diagnostic fragments for each of the parental species (Fig. 1 and Table 1). In the hybrid individuals, heterozygous patterns were observed due to the diagnostic bands inherited from each parental species (Fig. 1).

To produce fragments of different sizes using multiplex-PCR, primers for each parental species were designed in opposite directions (reverse and forward) for the GLOB gene. The primer *GLOB PcR* (reverse) was positioned on two mutations, and thus was specific for *P. corruscans*, whereas the primer *GLOB PrF* (forward) was developed based on three mutations and was specific for *P. reticulatum* (Table 1). For the EF1 α gene, primers were designed in different regions and were facing the reverse direction. Each primer contained a mutation; the primer *EF1 α PcR* was exclusive for *P. corruscans* and the primer *EF1 α PrR* was specific for *P. reticulatum* (Table 1). We did not develop species-specific primers for the rRNA 18S gene, because the sequences showed a low genetic divergence and only two polymorphic sites were identified, and thus, these were not considered to be ideal regions for primer design. In the electrophoresis analysis, multiplex-PCR of the GLOB gene (*GLOB SiluF*, *GLOB SiluR*, *GLOB PcR* and *GLOB PrF*) and EF1 α gene (*EF1 α F*, *EF1 α R*, *EF1 α PcR* and *EF1 α PrR*) demonstrated different patterns between *P. corruscans* and *P. reticulatum* (Fig. 2). Each synthesized primer generated a fragment of a distinct size (Table 1), thus producing diagnostic phenotypes for each species. The hybrid individuals had a pattern of two diagnostic bands, which were inherited from each parental species (Fig. 2). Thus, this marker can be used to distinguish the hybrids from the parental species due to its heterozygous nature.

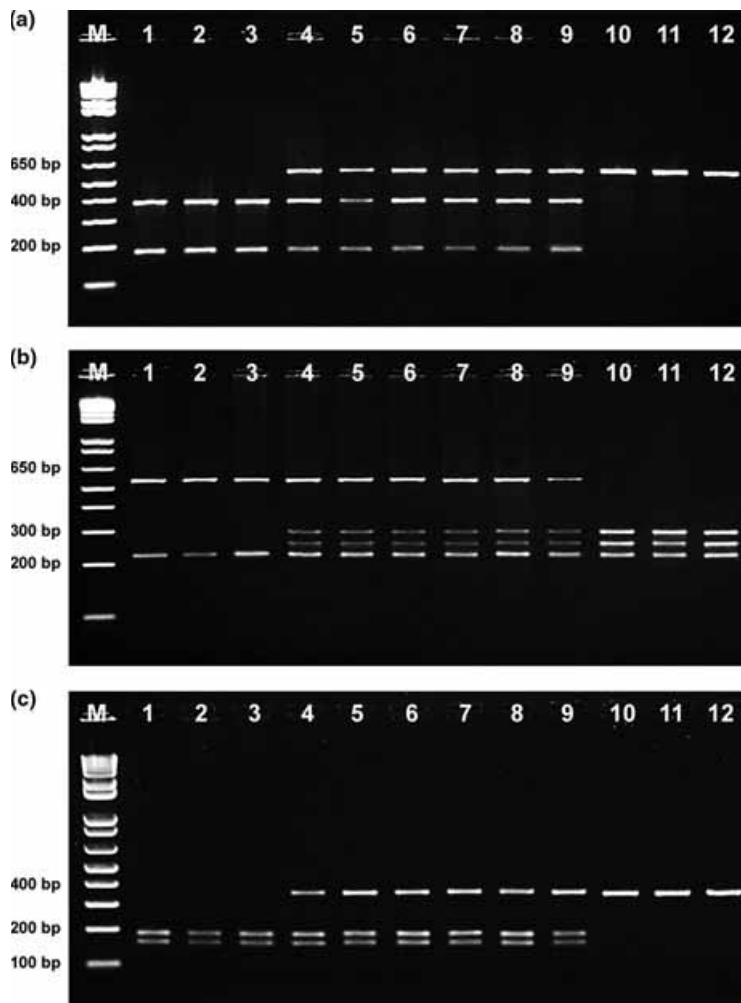


Figure 1 PCR-RFLP patterns of the GLOB gene digested with HpyAV (a), EF1 α cleaved with BpmI (b) and 18S digested with SmaI (c). Lanes: 1–3 *Pseudoplatystoma corruscans*, 4–6 ‘Pintachara’ hybrid, 7–9 ‘Cachapinta’ hybrid, 10–12 *P. reticulatum*; M – molecular weight marker (1 kB).

In the analysis of PCR-RFLP and multiplex-PCR, the patterns obtained by these methods were fixed over all reference samples studied. However, the use of only 20 individuals per species does not ensure the absence of polymorphisms in the nucleotide positions studied or in others, which should be further evaluated.

Molecular identification of the breeding stock

In the samples of the broodstock, nine individuals with different genotypes at any of the five markers were identified, which clearly characterizes the presence of post-F1 hybrids (Table 2). Indeed, we identified four hybrid F1 individuals because heterozygous genotypes were observed for all nuclear

markers (RAG2, GLOB, EF1 α and 18S); two samples were characterized as ‘Cachapinta’, because they inherited mtDNA (mitochondrial DNA) from *P. reticulatum*, and two specimens were characterized as ‘Pintachara’ based on the identification of mtDNA from *P. corruscans* (Table 2). Finally, only three specimens were identified as pure species, because they were scored as the same species at all five markers; these included two samples of pure *P. reticulatum* and one individual of pure *P. corruscans* (Table 2).

Discussion

To apply genetic management of fish hybrids in Brazilian aquaculture is extremely important to

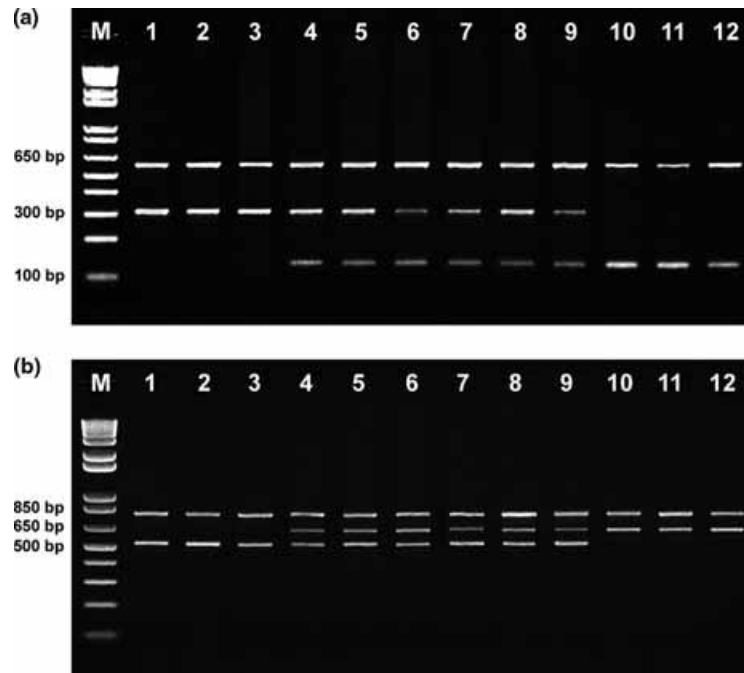


Figure 2 Electrophoresis analysis of multiplex-PCR products of the genes GLOB (a) and EF1 α (b). Lanes: 1–3 *Pseudoplatystoma corruscans*, 4–6 ‘Pintachara’ hybrid, 7–9 ‘Cachapinta’ hybrid, 10–12 *P. reticulatum*; M – molecular weight marker (1 kB).

Table 2 Individuals of the breeding stock identified morphologically (Phenotypes), and the molecular identification (Genotypes) by mitochondrial and nuclear markers

TAG numbers	Phenotypes	16S		RAG2		EF1 α		GLOB		18S		Genotypes
		Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	Pr	Pc	
207671	Pintado	x	–	x	x	–	x	x	x	–	x	Post-F1
189414	Pintado	x	–	x	x	–	x	–	x	–	x	Post-F1
209759	Pintado	x	–	–	x	x	x	x	x	–	x	Post-F1
228322	Pintado	x	–	x	x	x	x	–	x	–	x	Post-F1
220165	Pintado	–	x	x	x	x	x	x	x	x	x	‘Pintachara’
242188	Pintado	–	x	–	x	–	x	–	x	–	x	<i>P. corruscans</i>
212966	Cachara	x	–	x	–	x	–	x	–	x	–	<i>P. reticulatum</i>
203582	Pintado	x	–	x	x	–	x	x	x	–	x	Post-F1
207521	Hybrid	x	–	x	x	x	x	x	x	x	x	‘Cachapinta’
194799	Hybrid	–	x	x	x	x	x	x	x	x	x	‘Pintachara’
200159	Hybrid	x	–	–	x	–	x	–	x	x	x	Post-F1
198501	Cachara	x	–	x	–	x	–	x	–	x	–	<i>P. reticulatum</i>
210218	Hybrid	–	x	x	x	–	x	–	x	–	x	Post-F1
189199	Hybrid	–	x	–	x	x	x	x	x	–	x	Post-F1
240850	Hybrid	x	–	x	x	–	x	–	x	x	x	Post-F1
201322	Hybrid	x	–	x	x	x	x	x	x	x	x	‘Cachapinta’

Pc, *Pseudoplatystoma corruscans*; Pr, *Pseudoplatystoma reticulatum*.

establish methodologies for identification of hybrids and their respective parental species (Hashimoto et al. 2010). Accurate identification of fish hybrids

is important for the sustainable development of aquaculture and for assessing aquaculture production, as well as to allow a better understanding of

biodiversity issues (Bartley *et al.* 2001; Hashimoto *et al.* 2011). As demonstrated in this study, the methods of multiplex-PCR and PCR-RFLP proved to be efficient tools for fast and low-cost applications, and should be implemented routinely in fish monitoring for the adequate management of fish hybrids in natural and cultivated stocks. The difference between multiplex-PCR and PCR-RFLP is that the former technique does not require the additional time and cost of enzymatic digestion of the amplified DNA; however, the primer design has several limitations that should be taken into consideration (Hashimoto *et al.* 2010; Prado *et al.* 2011).

Currently, there is no institution that uses genetic resources to provide support to Brazilian fish farms for the proper management of strains that have undergone genetic manipulation. Through genetic identification analyses performed on a Brazilian fish farm, our results show preliminary data regarding the uncontrolled management of interspecific hybrid of *P. corruscans* and *P. reticulatum*. The analysed broodstock was composed mainly of hybrid individuals, which demonstrated that the fertility of these animals may seriously affect cultivated stocks, as reported for species of tilapia and carp (Mia, Taggart, Gilmour, Gheyas, Das, Kohinoor, Rahman, Sattar, Hussain, Mazid, Penman & McAndrew 2005; Mair 2007).

The concern is even greater because more than 50% of this breeding stock is composed of individuals belonging to post-F1 hybrid lineages, which causes substantial economic losses for this fish farm. In general, crosses involving post-F1 hybrids generate offspring with low viability and a high mortality rate (Almeida-Toledo, Bernardino, Oliveira, Foresti & Toledo-Filho 1996), which has already been diagnosed by the fish farmer. Thus, orientation measures are necessary to organize a new broodstock with pure species, as well as to avoid backcrosses or intercrosses and discard the hybrid individuals whose patterns of molecular identification identify them as such, especially the post-F1 individuals.

It was interesting to compare the results obtained by visual identification with the information generated through molecular identification. According to the aquaculturist, the analysed broodstock was composed of seven pure *P. corruscans* individuals; however, through molecular identification, only one specimen was identified as pure *P. corruscans*, illustrating that simple morphological

characterization, even of adult individuals, cannot be considered reliable. Consequently, hybrid lineages, especially post-F1 lineages, can be misidentified as pure species and erroneously used as broodstock. Similarly, such situation was detected in the trade of Serrasalmid juveniles because of the particular problem of morphological identification of hybrid juveniles (Hashimoto *et al.* 2011).

In Brazil, most aquaculture establishments are not licensed, and there are few legal regulations on aquaculture production (Suplicy 2007). In some states, such as Mato Grosso and Amapá, fish farming legislation reveals concerns about the production of hybrid juveniles, which should occur in laboratories properly licensed for this purpose, together with reports of sanitary inspections by competent agencies, as well as several criteria for the production of hybrid that must be followed. However, these preventive regulations are not adopted. The genetic tools validated in this study could enforce national laws and regulations and support the aim of the correct handling while avoiding the introduction of hybrids into the environment, which causes irreversible problems.

From an environmental and conservation perspective, the problem is still considered to be a major one. This is because hybrids between *P. corruscans* and *P. reticulatum* have been frequently reported and detected in natural environments. The case that deserves special attention is that of the Mogi Guaçu River in southeast Brazil, reported by Prado (2010). Historically, only *P. corruscans* was represented in the fish fauna of this river. However, in recent years, individuals with the morphology of *P. reticulatum* were collected that, in fact, were identified as hybrids between these species by means of molecular analyses. These escapes probably originated from fish farms; natural hybridization could not occur due to the absence of *P. reticulatum* in the Mogi Guaçu River. In recent samplings, it is even more rare to capture pure specimens of *P. corruscans* (J. A. Senhorini, pers. comm.), which provides evidence that these animals are backcrossing with the hybrids; through genetic introgression, this can lead to the extinction of this population of *P. corruscans*.

As producers do not invest in pure broodstock samples obtained in the natural environment due to the high price of investment, the trend has been towards the continuous use of broodstock composed of hybrid individuals. This is because breeding stocks are formed from specimens from other

fish farms, which generally provide hybrid samples (Hashimoto *et al.* 2011). Thus, due to the lack of investment in a systematic genetic improvement programme, absence of subsidies by the Brazilian government for obtaining pure broodstock and the fact that hybrids are being released into rivers and contaminating natural stocks, mitigating actions should be put in place urgently or the problems with fish hybrids will not be solved. The implementation of genetic monitoring would be a useful preventive measure to avoid the widespread loss of pure species in aquaculture, similar to what has been reported for species of tilapia after their general introduction and subsequent hybridization (Pullin 1988).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Almeida-Toledo L.F., Bernardino G., Oliveira C., Foresti F. & Toledo-Filho S.A. (1996) Gynogenetic fish produced by a backcross involving a male hybrid (female *Colosoma macropomum* × male *Piaractus mesopotamicus*) and a female *Piaractus mesopotamicus*. *Boletim Técnico do CEPTA* **9**, 31–37.
- Barthélémy R.M., Grino M., Pontarotti P., Casanova J.P. & Faure E. (2007) The differential expression of ribosomal 18S RNA paralogs from the chaetognath *Spadella cephaloptera*. *Cellular & Molecular Biology Letters* **12**, 573–583.
- Bartley D.M., Rana K. & Immink A.J. (2001) The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 325–337.
- Boecklen W.J. & Howard D.J. (1997) Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology* **78**, 2611–2616.
- Campos J.L. (2010) O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil* (ed. by B. Baldisserotto & L.C. Gomes), pp. 335–361. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.
- Carranza S., Bagnuà J. & Riutort M. (1999) Origin and evolution of paralogous rRNA gene clusters within the flatworm family DugesIIDae (Platyhelminthes, Tricladida). *Journal of Molecular Evolution* **49**, 250–259.
- Chevassus B. (1983) Hybridization in fish. *Aquaculture* **33**, 254–262.
- Crepaldi D.V., Faria P.M.C., Teixeira E.A., Ribeiro L.P., Costa A.A.P., Melo D.C., Cintra A.P.R., Prado S.A., Costa F.A.A., Drumond M.L., Lopes V.E. & Moraes V.E. (2006) O surubim na aquacultura do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **30**, 150–158.
- Docker M.F., Dale A. & Heath D.D. (2003) Erosion of interspecific reproductive barriers resulting from hatchery supplementation of rainbow trout sympatric with cutthroat trout. *Molecular Ecology* **12**, 3515–3521.
- Hashimoto D.T., Mendonça F.F., Senhorini J.A., Borolozzi J., Oliveira C., Foresti F. & Porto-Foresti F. (2010) Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture* **298**, 346–349.
- Hashimoto D.T., Mendonça F.F., Senhorini J.A., Oliveira C., Foresti F. & Porto-Foresti F. (2011) Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. *Aquaculture* **321**, 49–53.
- Lundberg J.G. & Littmann M.W. (2003) Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (ed. by R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr), pp. 432–446. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.
- Mair G.C. (2007) Genetics and breeding in seed supply for inland aquaculture. In: *Assessment of Freshwater Fish Seed Resources for Sustainable Aquaculture* (ed. by M.G. Bondad-Reantaso), pp. 519–548. FAO Fisheries Technical Paper, No. 501. FAO, Rome, Italy.
- Mallet J. (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 229–237.
- Mia M.Y., Taggart J.B., Gilmour A.E., Gheyas A.A., Das T.K., Kohinoor A.H.M., Rahman M.A., Sattar M.A., Hussain M.G., Mazid M.A., Penman D.J. & McAndrew B.J. (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.
- Moyer G.R., Burr B.M. & Krajewski C. (2004) Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zoological Journal of the Linnean Society* **140**, 551–575.
- Prado F.D. (2010) *Caracterização citogenética e molecular das espécies pintado (Pseudoplatystoma corruscans), cachara (Pseudoplatystoma reticulatum) e seus híbridos utilizados na piscicultura brasileira*. MSc dissertation, Universidade Estadual Paulista, Brazil.
- Prado F.D., Hashimoto D.T., Mendonça F.F., Senhorini J.A., Foresti F. & Porto-Foresti F. (2011) Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture Research* **42**, 1890–1894.

- Pullin R.S.V. (1988) *Tilapia Genetic Resources for Aquaculture*. International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines, 108pp.
- Rychlik W. (1995) Priming efficiency in PCR. *BioTechniques* **18**, 84–90.
- Scribner K.T., Page K.S. & Bartron M.L. (2001) Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 293–323.
- Suplicy F.M. (2007) Freshwater fish seed resources in Brazil. In: *Assessment of Freshwater Fish Seed Resources for Sustainable Aquaculture* (ed. by M.G. Bondad-Reantaso), pp. 129–143. FAO Fisheries Technical Paper, No. 501. FAO, Rome, Italy.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596–1599.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
- Toledo-Filho S.A., Almeida-Toledo L.F., Foresti F., Bernardino G. & Calcagnotto D. (1994) *Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui*. Cadernos de Ictiogenética 2, CCS/USP, São Paulo, Brazil.
- Vincze T., Posfai J. & Roberts R.J. (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* **31**, 3688–3691.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (ed. by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White), pp. 315–322. Academic Press, New York, USA.

Development and characterization of 16 microsatellites loci for the Neotropical catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* and cross-species analysis in *P. corruscans*: tools for population genetics and hybridization studies

Prado FD¹, Pardo BG², Guerra-Varela J², Senhorini JA³, Martínez P², Foresti F⁴, Porto-Foresti F¹

¹Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências, Departamento de Ciências Biológicas, Bauru, SP, Brazil.

²Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria, Departamento de Genética, Lugo, Spain.

³Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Pirassununga, SP, Brazil.

⁴Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Botucatu, SP, Brazil.

Keywords: 454 pyrosequencing, multiplex-PCR, microsatellite, diagnostic markers, hybridization.

Correspondence: F. Porto-Foresti, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP, Brazil. E-mail: fpforesti@fc.unesp.br. Telephone and fax number: +55 14 3103-6078.

Abstract

Sixteen polymorphic microsatellite primers were developed for *Pseudoplatystoma reticulatum* and provided an efficient multiplex protocol to amplify these loci in just four multiplex PCRs. A characterization of these loci in a single population demonstrated an average allele number of 7.8 and a mean H_e of 0.729. The analysis of a pooled sample of individuals of *P. reticulatum* demonstrated a higher allelic diversity with a mean of 10.2 alleles per locus and a mean H_e of 0.769. Cross-species amplification in *P. corruscans* revealed 14 polymorphic and two monomorphic loci (average of 7.4 alleles and H_e of 0.710 for the polymorphic loci). An interspecific comparison allowed detecting six diagnostic microsatellites, which may be highly valuable for the identification of these taxa and hybrids. Most microsatellites here

obtained showed moderate to high polymorphism levels, representing a useful tool for management, conservation and hybridization studies of these Neotropical catfish.

The catfishes *Pseudoplatystoma reticulatum* and *Pseudoplatystoma corruscans* belong to the Pimelodidae family, Siluriformes (Lundberg and Littmann 2003) and perform long distance migrations for reproduction in the watersheds of the Amazon, Paraguay and Parana Rivers (*P. reticulatum*) and San Francisco, Paraguay and Parana Rivers (*P. corruscans*) (Buitrago-Suárez and Burr 2007). Despite the lack of information about their conservation status, not included in the IUCN (International Union for Conservation of Nature), *P. corruscans* was classified as critically endangered in the state of São Paulo, Brazil (Mello et al. 2009). The continuous overfishing, together with the increasing destruction of aquatic environments represents a crucial factor that has led to the decline of *Pseudoplatystoma* populations (Carolsfeld et al. 2003). Another concerning issue for the conservation of these species is the large-scale induced production of hybrids in fish farms, which largely exceeds the cultivation of the pure species (Campos 2010; Porto-Foresti et al. 2010; Hashimoto et al. 2013). The hybrids can reproduce in captivity (Prado et al. 2012a) and have been detected in natural populations, which indicates high risks of admixture and extinction of unique parental genetic pools (Prado et al. 2012b).

In this study, we aimed to develop and characterize a set of microsatellites for *P. reticulatum* and, subsequently, check the cross-species amplification and allelic characterization in *P. corruscans*. We believe this is particularly important for future applications related to population genetics, broodstock management for aquaculture and conservation and the establishment of diagnostic microsatellites for these species and their hybrids.

DNA was extracted from fin clips using following the commercial kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega) protocols. Total genomic DNA from three individuals of *P. reticulatum* was pooled for sequencing on a Roche 454 GS FLX sequencer using the Titanium platform “Genome sequencer 20 System” (Instituto Agrobiotecnológico de Rosário – INDEAR, Argentina). Details of the pyrosequencing procedure have been described elsewhere (Margulies et al. 2005). Single reads were manually screened for sequences of 150-400 bp (bases pairs) containing microsatellites, considering ≥ 8 repeats for dinucleotide motifs and ≥ 6 for tri- tetra- and penta-nucleotide motifs. Primer pairs were designed using Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000).

For the initial characterization of the microsatellites, we studied 22 individuals of *P. reticulatum* from Cuiaba River, Paraguay basin, Brazil. Moreover, aiming to get a better

representation of the genetic diversity in this species and for interespecific comparisons, we analyzed a pooled sample of 20 individuals coming from 8 distinct populations from the same area. Cross species amplification were conducted on 12 specimens of *P. corruscans* from four different populations of Paraguay and Upper Parana basins. Multiplex PCRs (A-D, table 1) were performed in a final volume of 10 μ l containing 100 μ M of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1X Taq buffer, 0.5 units of Taq polymerase (Quiagen Master mix), 0.4 μ M reverse primer, 0.4 μ M fluorescently-labeled forward primer (Applied Biosystems) and 30 ng of genomic DNA. Amplifications were performed in a thermal cycler Veriti™ (Applied Biosystems) for 15 min. at 95 °C followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 58 °C, 1 min s at 72 °C and a final extension of 60 °C for 30 min.

Amplification products were checked by electrophoresis on 1% agarose gel using 100 bp DNA ladder (Invitrogen) and SYBR Safe™ (Applied Biosystems) and each multiplex PCR was loaded separately on an automated DNA sequencer ABI prism_3730 (Applied Biosystems). Allele sizes were scored against a GeneScan500 LIZ size standard (Applied Biosystems) using Gene Mapper 3.7 (Applied Biosystems). Micro-checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) was employed to check the presence of null alleles and genotyping errors. Cervus 3.0 (Marshall et al. 1998) was used to estimate genetic diversity: number and size range of alleles, expected (He) and observed (Ho) heterozygosities. Genepop 3.4 (Raymond and Rousset 1995) was used to test for deviations from HWE (Hardy Weinberg Equilibrium). Significance values (P=0.05) were adjusted by the Bonferroni correction (Rice 1989).

The first characterization of the loci in *P. reticulatum* showed 3 to 12 alleles (mean 7.8) and He ranging from 0.498 to 0.885 (mean=0.728) (Table 1). Prt37 presented significant deviations from HWE (P<0.0032) and Microchecker software suggested the presence of null alleles for this loci and Prt3, reflected by a homozygote excess. Analisis including all individuals of this species showed a mean A=10.2 and He=0.771 (Table 2). Amplifications in *P. corruscans* demonstrated 14 polymorphic and 2 monomorphic loci; and polymorphic analyses revealed 2 to 12 alleles (mean=7.4) and a mean He of 0.710 (ranging from 0.083 to 0.928) (Table 2). We also observed six loci with non-overlapping allelic sizes between species (Table 2).

The most microsatellite loci here developed presented medium to high polymorphism and the PCR-multiplex protocols represented an efficient molecular tool with relative reduced costs and time. The 100% success in the cross-amplification between these species suggest that these loci can also be useful for other Pimelodidae fish. These markers can to be applied

in evolutionary and populational genetic studies and used in projects for management of *P. reticulatum* and *P. corruscans* in aquaculture, conservation plans and hybridization investigations.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol Evol* 16(11):613-622.
- Buitrago-Suárez UA, Burr BM (2007) Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Blecker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa* 1512(1):1-38.
- Campos JL (2010) O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: Baldisserotto B, Gomes LC (eds) *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, pp. 335-361.
- Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A (2003) *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust/World Bank/ IDRC, Victoria.
- Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2013) Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. *Aqua Res* 44(6):876-884.
- IBAMA (2007) *Estatística da pesca Brasil – grandes regiões e unidades da federação*. IBAMA, Brasília.
- Lundberg JG, Littmann MW (2003) Family Pimelodidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris-JR CJ (orgs) *Check List of the freshwater fishes of South and Central America*, Edipucrs, Porto Alegre, pp. 432-446.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7:639–655.

- Mello PH, Venturieri RLL, Honji RM, Moreira RG (2009) Threatened fishes of the world: *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae). *Env Biol Fishes* 85(4):359–360.
- Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F (2010) Híbridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas. In: Baldisserotto B, Gomes LC (eds) *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, pp. 589-606.
- Prado FD, Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012b) Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *Fish Res* 125-126:300–305.
- Prado FD, Nunes TL, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2012a) Cytogenetic characterization of F₁, F₂ and backcross hybrids of Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes). *Gen Mol Biol* 35(1):57-64.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (ver. 3.3): a population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3. [http:// www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html). In: S Krawetz and S Misener (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ. USA, pp. 365–386.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535– 538.

Table 1 – Description of primer sequences and characterization of 16 polymorphic microsatellites loci in *P. reticulatum*.

Loci	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	A	Size range (bp)	Ho	He	Gen Bank no.	M-PCR
Prt3	F: AGTGGCGTTAGTCTGTGTG ^{NED} R: CTCTGCCATCAATACGGCTCA	(TG) ₁₃	5	185-197	0.409	0.660	KF701044	
Prt4	F: AGGCGACAGCACTAACAGT ^{VIC} R: GATGGAAATGTGGCTGGATCT	(TA) ₁₀	7	177-191	0.727	0.799	KF701045	A
Prt25	F: CAAGCGCTGTGTATCTT ^{PET} R: GATCATGCTTGGCTCAGACTT	(CA) ₁₅	10	171-207	0.818	0.798	KF701050	
Prt30	F: CACCTGAGACACCACCGT ^{6-FAM} R: CCGAGGTAGGAGAGAAAGAG	(TC) ₈	8	105-133	0.455	0.605	KF701052	
Prt5	F: GTGCTTCTGTGTGAGGTA ^{PET} R: TGGCAACTGAGGCTTACTGA	(TG) ₁₅	10	246-270	0.909	0.885	KF701046	
Prt6	F: CAGATTGCTGATGTGCTGTG ^{NED} R: CTGCGTGATAACTTGCCAGA	(CA) ₁₅	3	210-218	0.455	0.553	KF701047	B
Prt27	F: TGTCTCGCATCAAACACTACGC ^{VIC} R: GTCGAAACCGGGACCTTC	(AO) ₁₆	7	211-233	0.591	0.498	KF701051	
Prt34	F: GGTAGACCCGAAAGACAGAAACA ^{6-FAM} R: GGAACCTCTGACCTCCTAATGAA	(TAGA) ₁₄	11	172-232	0.818	0.862	KF701053	
Prt11	F: TAGCAGCAGCGGATGAGAT ^{6-FAM} R: CCTAATGTCCAGGGATTTGC	(GT) ₁₂	7	254-272	0.682	0.717	KF701048	
Prt36	F: ACCGAGCACAGCACAGAAC ^{NED} R: AAGGCAATGGTTGGAAGAA	(AGAT) ₁₄	6	232-252	0.682	0.799	KF701055	C
Prt37	F: GGATTAGGATCGAGGTGATCTG ^{PET} R: AATTCTCCTTCGAGACTTGG	(TATC) ₁₇	10	218-256	0.318	0.829*	KF701056	
Prt40	F: AGACCGTTCACACGTCCTCT ^{VIC} R: TGCAGTTGGTGGAGTTGATG	(ACAT) ₇	4	252-260	0.500	0.500	KF701059	
Prt12	F: AGAGCCATGCTGTTGTGTG ^{PET} R: GTTTGTGGACTCGGTGACT	(CA) ₁₃	5	272-282	0.636	0.675	KF701049	
Prt35	F: TTCCACACAACCACAGAAA ^{NED} R: GAAACCACAGAATGCCCTCA	(TTC) ₉	12	333-384	0.864	0.875	KF701054	D
Prt38	F: CACACACCGCAACTTCTCAC ^{VIC} R: TTGCTCTCACACACTGCTT	(ATA) ₁₁	8	316-343	0.636	0.783	KF701057	
Prt39	F: GCCGCCATATTGGATCAA ^{6-FAM} R: GCGACTCATATACCACCTCGT	(ATA) ₁₁	11	275-306	0.727	0.818	KF701058	

F: forward, R: reverse, forward primers labeled with fluorescence (PET, VIC, 6-FAM, NED), bp: base pairs, A: allele number, Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, *loci presenting significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P<0.0032) after Bonferroni correction, M-PCR: multiplex-PCR.

Table 2 – Cross-species analysis in *P. corruscans* and interspecific comparisons.

Loci	<i>P. reticulatum</i>				<i>P. corruscans</i>			
	A	Allelic range size (bp)	Ho	He	A	Allelic range size (bp)	Ho	He
Prt3	7	183-197	0.571	0.802	1	159	-	-
Prt4	7	177-191	0.643	0.779	5	176-180	0.333	0.714
Prt5	16	220-282	0.857	0.892	11	225-279	1.000	0.909
Prt6	7	208-222	0.500	0.710	4	210-228	0.417	0.562
Prt11	10	252-272	0.786	0.805	7	260-290	0.750	0.797
Prt12	6	272-284	0.619	0.701	7	296-310	0.667	0.822
Prt25	14	171-207	0.810	0.822	1	169	-	-
Prt27	8	211-239	0.524	0.572	12	251-285	0.917	0.928
Prt30	12	97-133	0.585	0.681	7	69-91	0.917	0.786
Prt34	11	172-232	0.857	0.871	12	188-248	0.917	0.928
Prt35	14	333-384	0.872	0.884	2	354-357	0.083	0.083
Prt36	8	232-268	0.805	0.840	12	329-405	0.750	0.902
Prt37	14	218-280	0.447	0.868	11	196-252	0.667	0.920
Prt38	11	286-343	0.757	0.823	2	307-310	0.083	0.083
Prt39	14	228-306	0.667	0.751	8	260-287	0.917	0.855
Prt40	4	250-260	0.537	0.536	4	248-256	0.500	0.656

A: allele number, bp: base pairs, Ho: observed heterozygosity, He: expected heterozygosity, in bold, the loci with diagnostic allele sizes between species.