

***Análise genética de Pseudoplatystoma  
corruscans (pintado) e P. fasciatum (cachara) e  
de um híbrido, com base em marcadores  
mitocondriais e nucleares***

Alberto José Prioli, Laudenir Maria Prioli, Sônia Maria Alves Pinto  
Prioli, Renata de Souza Panarari, Thaís S. Bignotto, Thiago Cintra  
Maníglia, Vivian Amanda de Carlos, Horácio Ferreira Júlio Jr.

### Introdução

O gênero *Pseudoplatystoma* pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul e é composto pelas espécies de maior porte da família Pimelodidae. Na bacia platina ocorrem as espécies *Pseudoplatystoma corruscans*, popularmente conhecida como “pintado” ou “sorubim” e *Pseudoplatystoma fasciatum*, espécie popularmente conhecida como “cachara”. Na bacia do São Francisco é encontrada apenas a espécie *P. corruscans*. Por outro lado, na bacia amazônica são encontradas as espécies *P. fasciatum* e *P. tigrinum* (caparari, pirambucu) (Welcomme, 1985; Petrere, 1995; Marques, 1993).

São espécies migratórias de alto valor comercial e de grande importância na pesca das bacias em que ocorrem. A importância comercial está relacionada com a alta qualidade de sua carne, que é muito apreciada e garante um elevado valor de comercialização. Espécies deste gênero estão entre as de maior importância comercial nos rios Amazonas e Paraná (Welcomme, 1985, Marques, 1993), na bacia hidrográfica do rio Miranda (Resende *et al.* 1995) e no rio São Francisco (Tavares, 1997). Essas espécies apresentam uma alta importância ecológica, uma vez que são grandes predadores e bastante abundantes nas regiões onde ocorrem.

A utilização dos rios para a geração de energia elétrica tem interferido nas rotas migratórias, reduzindo a captura de grandes migradores como o *P. fasciatum* e *P. corruscans* e o cachara (Petrere, 1995). Na bacia do alto rio Paraná, *P. corruscans* ocupa um habitat altamente alterado por ações antropogênicas, com alto risco de

desaparecimento, como já ocorrido em trechos superiores da bacia. Apesar da importância comercial e ecológica dessas duas espécies, o conhecimento de sua biologia e ecologia ainda é relativamente precário. Por causa da diminuição da pesca de *P. corruscans* e *P. fasciatum*, recentemente, tem havido grande interesse em seu cultivo em razão do potencial que ele apresenta para a piscicultura (Sato *et al.* 1997). Apesar da ausência de informações na literatura, sabe-se que em cativeiro é possível a obtenção de híbridos entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* (Carmino Hayashi, comunicação pessoal). O possível escape de híbridos de tanques de piscicultura representa uma ameaça à integridade genética de populações locais devido ao potencial risco de retrocruzamento, com conseqüente introgressão de genes. Na bacia do alto rio Paraná, onde não ocorre naturalmente *P. fasciatum*, o escape de híbridos representa um risco potencial para *P. corruscans*. Portanto, marcadores moleculares que caracterizem e discriminem as duas espécies são essenciais para a avaliação e o monitoramento das populações em risco.

A divergência genética entre populações de *P. corruscans* e *P. fasciatum* pode ser quantificada por técnicas moleculares baseadas em DNA. Existem várias metodologias que podem ser empregadas para essa finalidade. A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), proposta por Williams (1990), tem sido amplamente utilizada na detecção de variação genética em espécies e populações de peixes (Alberts *et al.*, 1999; Kuusipalo, 1999; Bielawski e Pumo, 1997; Caccone *et al.* 1997; Callejas e Ochando, 1998; Elo *et al.*, 1997). O RAPD baseia-se na amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain*

*Reaction*). No entanto, a principal característica do RAPD é o emprego de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) curtos, com aproximadamente 10 bases. Geralmente, apenas um *primer* é utilizado na reação. A definição das seqüência de *primer* RAPD é arbitrária e amplifica regiões anônimas de todo o genoma.

A técnica conhecida como SPAR (*Single Primers Amplifications Reactions*) utiliza um único *primer* com seqüência repetitiva de um microssatélite ou SSR. O segmento de DNA amplificado compreende aquele localizado entre dois blocos de microssatélites. O marcador SPAR foi empregado porque detecta diferenças entre espécies próximas, apesar de revelar pouca variabilidade dentro de uma mesma espécie.

Genes mitocondriais que codificam proteínas, tRNAs e rRNAs evoluem mais rapidamente do que os genes nucleares, embora sejam regiões relativamente conservadas do genoma mitocondrial, fazendo com que sejam interessantes para estudos filogenéticos entre espécies mais distantes (Meyer, 1994; Saccone *et al.*, 2000, 2002). A região controle é a principal seqüência de DNA não codificadora e a mais variável do DNAmT de metazoários, incluindo-se os peixes.

A região de origem da replicação do DNA mitocondrial, caracterizada pelo *displacement loop*, conhecido como *D-loop*, contém seqüências altamente polimórficas. Por ser variável dentro da espécie, pode ser utilizada para avaliação da diferenciação genética de populações ou espécies próximas (Meyer, 1990).

A obtenção de dados sobre a diferenciação genética entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* é fundamental para o conhecimento sobre a estrutura de populações dentro de cada espécie e sobre a possibilidade de fluxo gênico e interações entre as duas espécies. Nesse tipo de estudo, o emprego de metodologias moleculares com bases genéticas diferentes, permite a comparação de informações sobre a eficiência das técnicas em discriminar espécies próximas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diferenciação genética entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* com as técnicas RAPD, SPAR e seqüências *D-loop* do DNA mitocondrial e também identificar marcadores moleculares espécie-

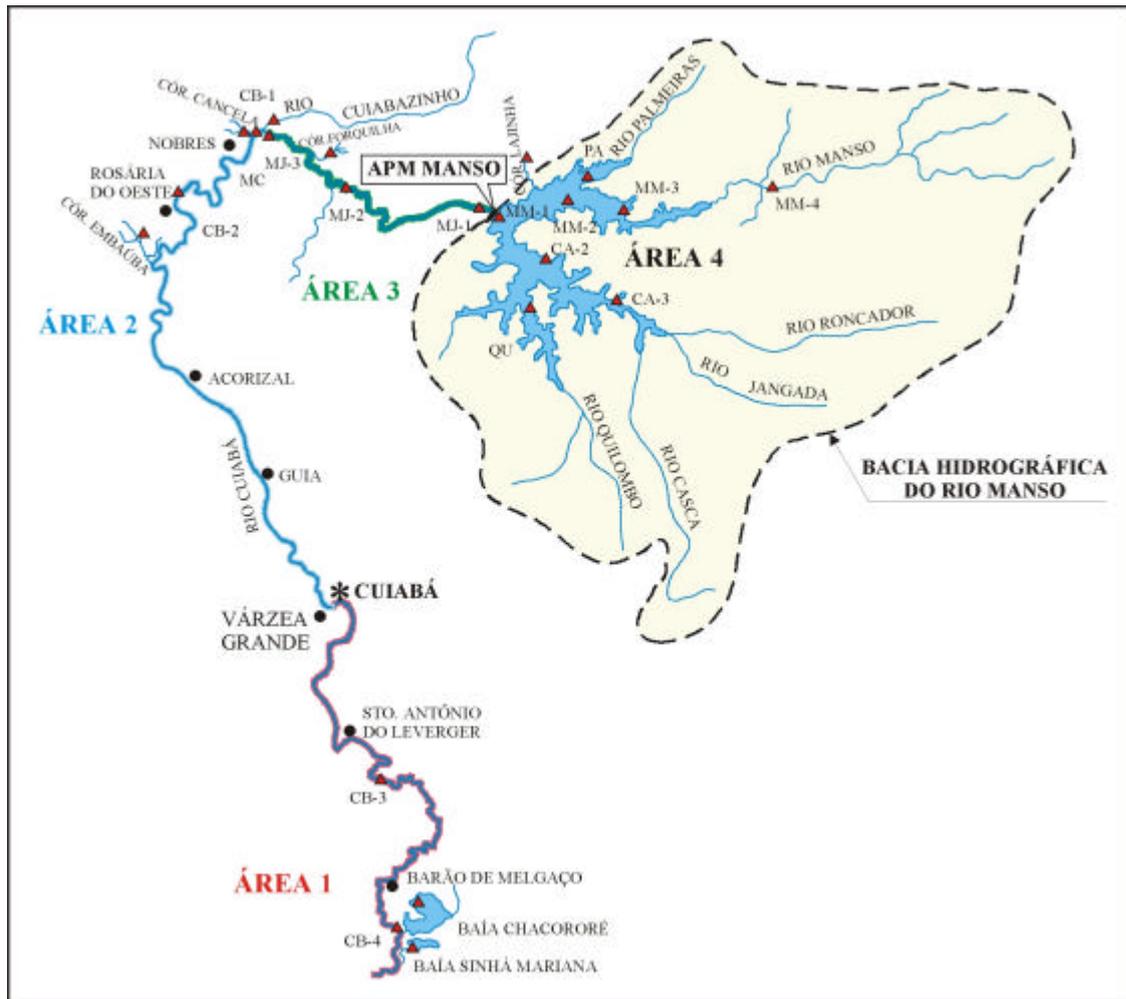
específicos para caracterizar e discriminar as duas espécies visando futuras avaliações e o monitoramento das populações dessas espécies em risco.

## Material e Métodos

### Amostragem e Extração de DNA

Foram analisados 29 espécimes de *Pseudoplatystoma corruscans* e 30 espécimes de *Pseudoplatystoma fasciatum*, coletados nos rios Manso e Cuiabá, na região Norte do Pantanal, na sub-bacia do rio Paraguai, Estado do Mato Grosso. Além disso, foram analisados 12 exemplares de *P. corruscans*, que foram coletados no rio Baía, na planície alagável do alto rio Paraná, na região da divisa entre os Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul. Foi também analisado um espécime apresentando características intermediárias entre *P. corruscans* e *P. fasciatum*, que foi coletado no início do ano de 2003 na planície alagável do alto rio Paraná.

Os procedimentos para a extração do DNA e aplicação das técnicas de PCR foram conduzidos no Laboratório de Genética Geral do DBC-UEM e no Laboratório de Genética do Nupélia – UEM. Tecidos de nadadeiras adiposas foram removidos e preservados em etanol 70%. Amostras de DNA total foram extraídas de acordo com Monesi (1998), com algumas modificações. Amostras de tecido muscular, com cerca de 100 mg, foram maceradas em nitrogênio líquido. Ao extrato obtido adicionou-se tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, espermina 0,15 mM e espermidina 0,15 mM), tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%) e proteinase K (20 ?g/?L). As amostras foram então incubadas em banho-maria com agitação, a 37°C por cerca de uma hora. A seguir, o DNA foi extraído com fenol e clorofórmio, precipitado com solução salina e etanol gelado, e ressuspenso em TE diluído (0,1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,01 mM EDTA) contendo RNase (20 ?g/ml). As amostras foram armazenadas a -20°C. Alíquotas foram usadas para quantificação das amostras por comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago ? em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (20 ?g/100 ml).



**Figura 1.** Área de coleta de *Pseudoplatystoma corruscan* e *P. fasciatum* nos rios Cuiabá e Manso, na sub-bacia do rio Paraguai.

### Amplificação e análise de locos RAPD

A técnica de RAPD foi utilizada para avaliar o polimorfismo molecular entre os espécimes de *P. fasciatum* e *P. corruscans*. Os primers OPX17, OPA10, OPA16, OPW05, OPW09, OPW11 e OPW15 (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) foram selecionados para as análises. As condições de amplificação seguiram metodologia utilizada como rotina no laboratório, que é baseada no protocolo recomendado por Bardakci e Skibinski (1994). A mistura de reação de amplificação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM),  $MgCl_2$  2 mM, *primer* 0,46  $\mu$ M, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq*-polimerase (Gibco BRL), DNA (10 ng) e água suficiente para completar 13  $\mu$ L. As reações de

amplificação foram realizadas no termociclador MJ Research Inc. programado para 1 ciclo de 4 min a 92 °C, 40 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min. 30 s a 40 °C e 2 min a 72 °C. Imediatamente após o último ciclo de amplificação, a mistura de reação foi mantida durante 5 min a 72 °C e resfriada durante 20 min. a 4°C. Controles negativos, sem DNA, foram incluídos em cada conjunto de amplificações. Amostras consistindo de 7  $\mu$ L da mistura de reação de PCR, após amplificação, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (20  $\mu$ g/100 mL). A eletroforese foi realizada em tampão TBE (tris-borato), a 5 V.cm<sup>-1</sup>, durante 45 horas. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada sob luz ultravioleta e o gel foi fotografado para análise. O tamanho dos fragmentos foi

estimado pela comparação com marcador Ladder 100 pb (Gibco BRL).

A partir dos resultados de RAPD foram realizadas comparações entre indivíduos e entre populações, com base na ausência e presença de bandas de DNA no gel de eletroforese. A distância genética não tendenciosa de Nei (Nei, 1978), o índice de fixação  $G_{ST}$  e o número de migrantes ( $Nm$ ), entre populações, foram estimados com o programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). O teste de significância de  $G_{ST}$  foi efetuado conforme Workman e Niswander (1970). Com este programa também foram estimados o índice de diversidade de Shannon (Zar, 1974) e a porcentagem de locos polimórficos dentro das populações. A matriz de distâncias de Nei e Li (1979) entre todos os indivíduos, tomados dois a dois, foi construída com o programa RAPDPLOT (Black, 1997). A análise de agrupamento, a partir da matriz de complementos de Nei e Li, foi realizada pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Methods of Arithmetic Means*) com o programa PHYLIP versão 3,6 (Felsenstein, 1995).

#### Amplificação e análise de locos SPAR

Fragmentos de DNA foram aplicados a partir de amostras de DNA genômico dos espécimes em estudo, utilizando-se os *primers* (GGAC)<sub>3</sub>T, (GGAC)<sub>3</sub>C e (GGAC)<sub>4</sub>. A mistura de reação de amplificação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primer* 0,46 µM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq*-polimerase, DNA (10 ng) e água suficiente para completar 13 µL. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador MJ Research Inc. programado para 4 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 51 °C e 1 min a 72 °C, seguidos de 29 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a 48 °C e 1 min a 72 °C. Após o último ciclo de amplificação, a mistura de reação foi resfriada e mantida a 4°C. Controles negativos, sem DNA, foram incluídos em cada conjunto de amplificações. Amostras consistindo de 7 µL da mistura de reação de PCR, após amplificação, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). A eletroforese foi realizada em tampão TBE (tris-borato), a 5 V.cm<sup>-1</sup>, durante 4-5 horas, os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e o gel foi fotografado para

análise. O tamanho dos fragmentos foi estimado pela comparação com marcador Ladder 100 pb (Gibco BRL).

#### Amplificação e análise de seqüências do DNA mitocondrial

A região controle do genoma mitocondrial foi parcialmente amplificada por PCR a partir de amostras de DNA total dos espécimes em estudo, consistindo de 7 indivíduos de *P. fasciatus*, 07 indivíduos de *P. corruscans* amostrados no rio Manso e Cuiabá e 15 indivíduos de *P. corruscans* amostrados no rio Baía A amplificação foi realizada utilizando-se *primers D-loop* apresentados por Meyer *et al.* (1990). O fragmento de DNAm<sub>t</sub> amplificado corresponde à região hipervariável da seqüência *D-loop*. Foram seqüenciados os fragmentos amplificados em duas reações de PCR independentes. Além disso, foram seqüenciadas as duas cadeias nucleotídicas de cada fragmento de DNA obtido em cada reação.

A mistura de reação de amplificação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq*-polimerase, DNA genômico 15 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 µL. Os fragmentos de DNA foram amplificados em 1 ciclo de 4 min a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, 40 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 2 min a 72°C, e um último ciclo de 15 s a 94°C, 30 s a 56°C e 10 min a 72°C. Uma amostra de cada mistura de reação, contendo cerca de 50 ng de fragmentos de DNA amplificados, foram usadas diretamente em reações de seqüenciamento com *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing*, em um seqüenciador automático ABI-3100 (Perkin Elmer), de acordo com instruções do fabricante. As seqüências nucleotídicas foram alinhadas e analisadas no programa *Vector NTI Suite version 6.0 software (Informax, Inc.)*. Todas as seqüências de mtDNA foram alinhadas com o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Análises genéticas das seqüências mitocondriais foram realizadas com o programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) e PAUP 4.0 (Swofford, 2002). Foram determinadas as distâncias genéticas de Kimura 2-parâmetros entre os indivíduos. A matriz de distâncias foi utilizada para construir um dendrograma com o algoritmo *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987), com

análises de *bootstrap* baseadas em 10.000 reamostragens.

## Resultados

Os dados produzidos pelas técnicas de RAPD e SPAR são de natureza binária, sendo que as comparações entre as populações são realizadas a partir da presença ou ausência de fragmentos RAPD ou SPAR para cada indivíduo. Portanto, a divergência genética entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* é detectada principalmente pela ocorrência ou não de determinadas bandas (locos).

Os resultados obtidos com a técnica SPAR foram satisfatórios. Na análise dos géis, foram observados perfis eletroforéticos semelhantes em indivíduos da mesma espécie, ou seja, bandas pertencentes a um indivíduo estavam presentes também nos outros indivíduos desta mesma espécie (Figura 2). Por outro lado, houve bandas que ocorreram em todos os indivíduos de ambas as espécies, tais bandas são denominadas monomórficas. Pôde-se visualizar bandas monomórficas e exclusivas pertencentes apenas ao pintado ou ao cachara. Bandas monomórficas e exclusivas dentro de cada espécie são marcadores espécie-específicos.

Com a técnica de RAPD os resultados também foram de boa qualidade. Como é um marcador bom para detectar diferenças dentro de uma mesma espécie (marcador intraespecífico), houve bandas que apareceram apenas em alguns indivíduos, evidenciando as diferenças que ocorrem mesmo dentro de uma espécie (Figura 3). Assim como verificado na técnica SPAR, foram encontradas bandas monomórficas que ocorreram em todos os indivíduos das duas espécies e bandas monomórficas e exclusivas de *P. corruscans* ou de *P. fasciatum*, evidenciando a diferenciação entre as espécies. Foram amplificados, no total, 68 locos RAPD, sendo que 13 são monomórficos e exclusivos de pintado, 13 monomórficos e exclusivos de cachara e 15 monomórficos para ambas as espécies, 5 polimórficos e exclusivos de *P. corruscans* e 9 polimórficos e exclusivos de *P. fasciatum*.

A distância de Nei (1978), calculada a partir dos dados de RAPD, foi estimada como 0,7627. O índice de fixação  $F_{ST}$  de Wriggt foi 0,7189. Índice de fixação acima de 0,25 indica que as populações estudadas estão altamente diferenciadas geneticamente. O gráfico de dispersão em coordenadas principais e o dendrograma foram construídos, mostrando que o polimorfismo existente nas bases genéticas das espécies foi evidenciado pela técnica de RAPD, sendo suficiente para separar as duas populações (Figuras 4 e 5).

Nas amostras das populações de pintado e cachara dos rios Manso e Cuiabá, onde as duas espécies coexistem, não foi encontrado nenhum indivíduo que apresentasse, simultaneamente, bandas específicas de pintado e de cachara, isto é, nenhum híbrido natural foi encontrado. Por outro lado, os marcadores moleculares demonstraram que aquele indivíduo coletado na planície alagável do alto rio Paraná, que possuía características morfológicas intermediárias entre *P. corruscans* e *P. fasciatum*, é realmente um híbrido inter-específico, provavelmente proveniente de piscicultura.

Os fragmentos do DNA mitocondrial amplificados (Figura 6) foram seqüenciados. Este segmento contém parte da região *D-loop*, parte do gene *cyt b* e as seqüências completas dos genes *tRNA<sup>Thr</sup>* e *tRNA<sup>Pro</sup>*. Foi encontrada baixa variação, dentro e entre as duas espécies, nos genes *tRNA<sup>Thr</sup>* e *tRNA<sup>Pro</sup>*, assim como na seqüência parcial do *cyt b*, não discriminando *P. corruscans* e *P. fasciatum*. O segmento *D-loop*, entretanto, evidenciou a diferenciação genética entre e dentro das espécies, como representado na Figura 7. Com as seqüências nucleotídicas da região *D-loop* do mtDNA foram estimadas as distâncias genéticas pelo método 2-parâmetros de Kimura, que pondera transições e transversões. A distância Kimura 2-parâmetros entre as duas espécies foi de 0,074. Esta estimativa de distância interespecífica é aproximadamente dez vezes maior do que as médias das estimativas dentro da população de pintado e dentro da população de cachara, respectivamente, 0,008 e 0,007.

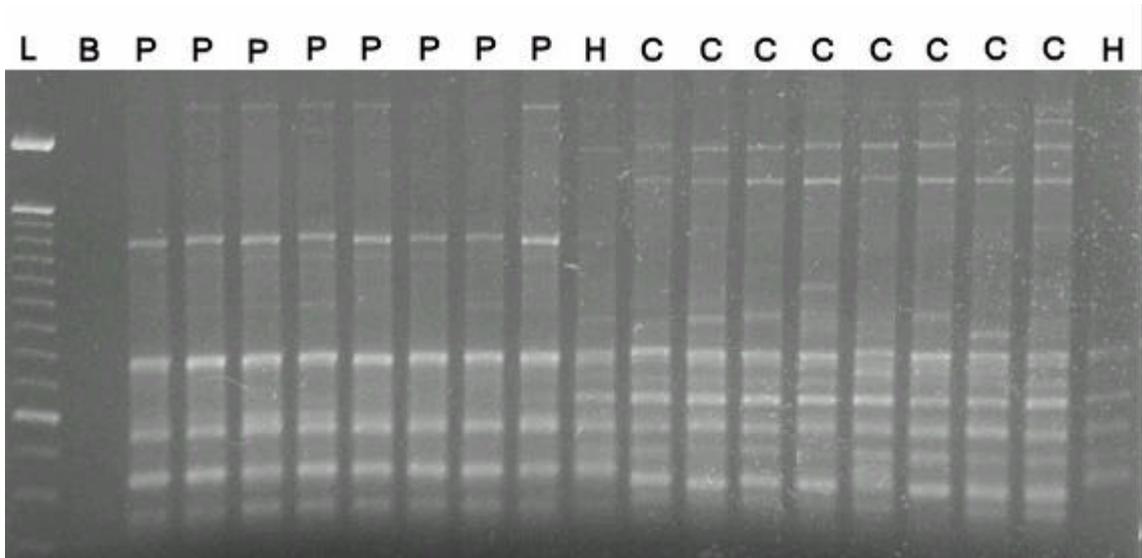
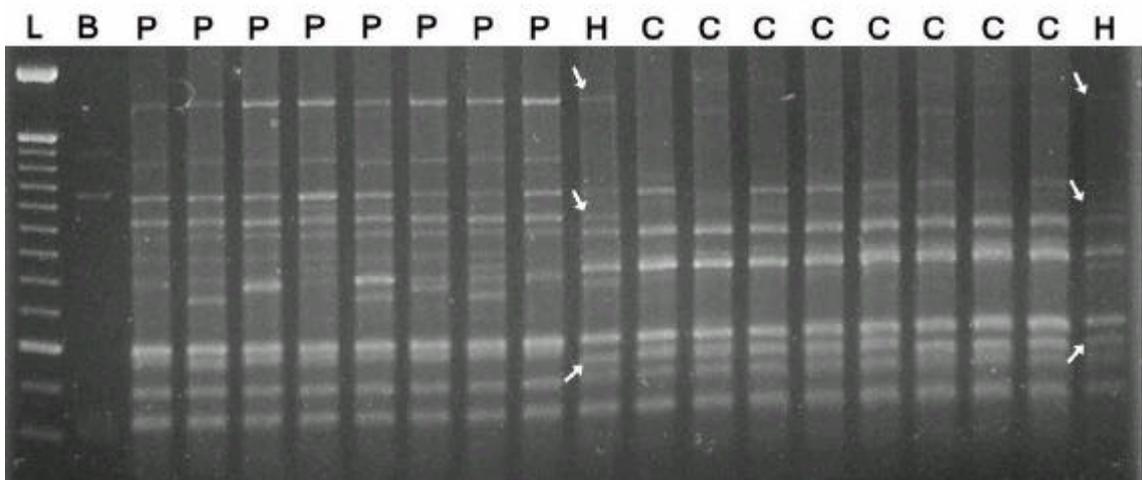
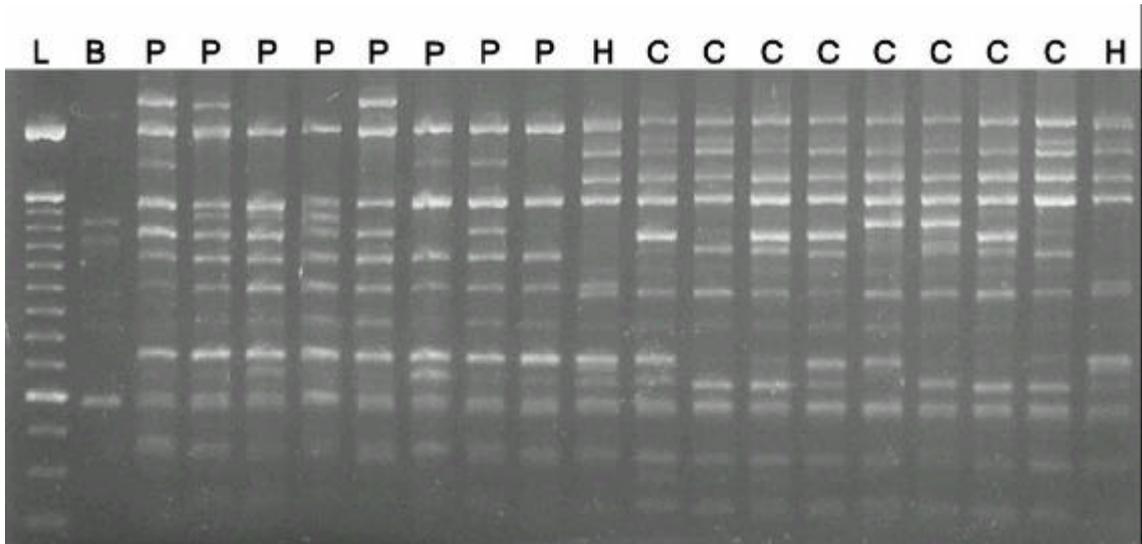
**A****B**

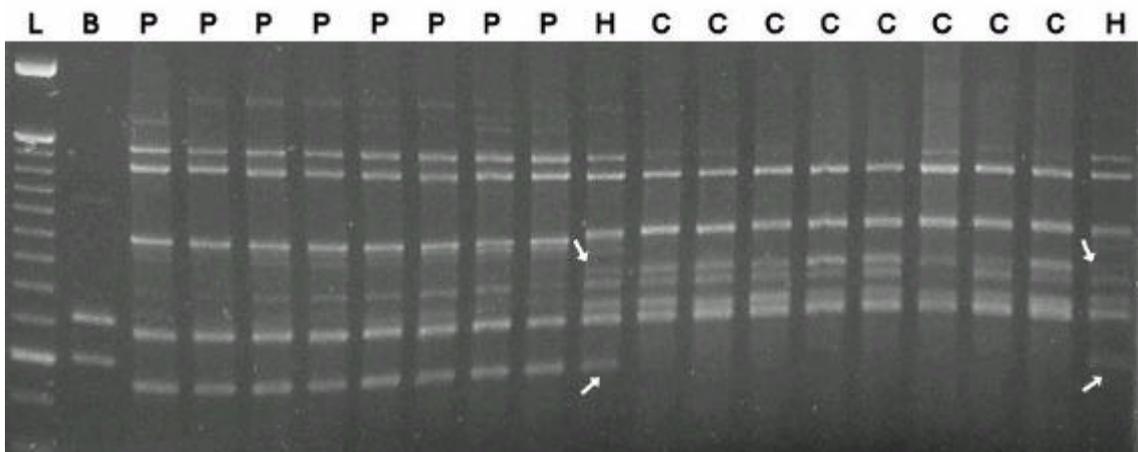
Figura 2. Marcadores moleculares SPAR. Figura A representa amplificação com o primer  $(GGAC)_3T$  e na Figura B foi utilizado o primer  $(GGAC)_4$ . Observar bandas monomórficas e exclusivas (marcadores espécie-específicos) do pintado ou do cachara. Observar também bandas exclusivas de cachara e bandas exclusivas de pintado presentes no híbrido L. Marcador Ladder 100bp; B. Controle sem DNA; P. Pintado; H. Híbrido; C. Cachara.

**A**

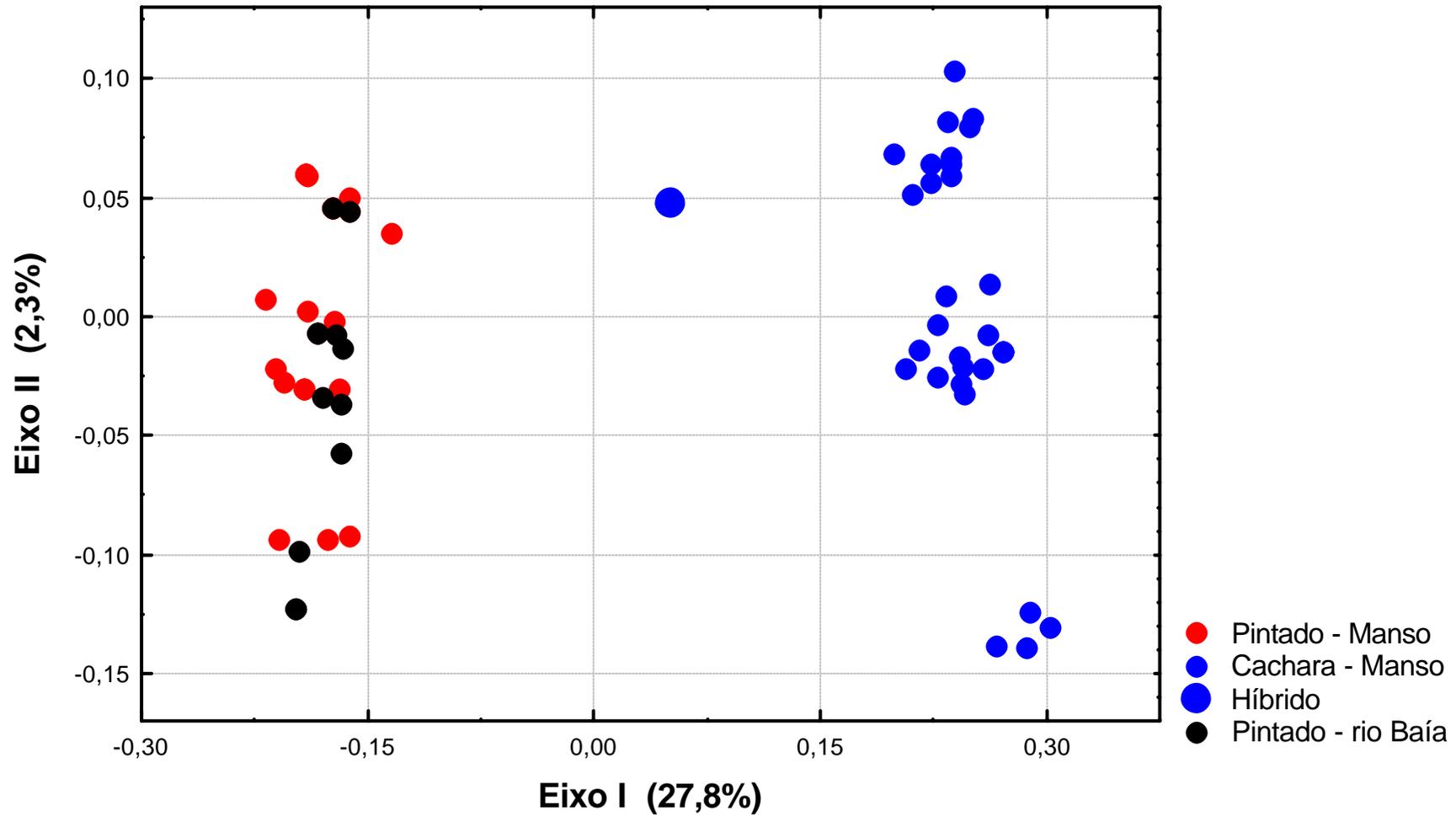
?



**B**



**Figura 3.** Marcadores moleculares RAPD. **Figura A** representa amplificação com o primer OPA16 e **Figura B** com o primer OPW05. **L.** Padrão molecular Ladder 100 pb Gibco BRL. **B.** Controle sem DNA; **P.** Pintado; **H.** Híbrido; **C.** Cachara.



**Figura 4** Gráfico de dispersão em coordenadas principais de *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. fasciatum* e de um híbrido, coletados na planície alagável do alto rio Paraná (MS) e no rio Manso/Cuiabá (MT). A matriz de complementos aritméticos dos coeficientes de similaridades de Nei e Li, obtida de marcadores RAPD, foi corrigida pelo método de Lingoes.

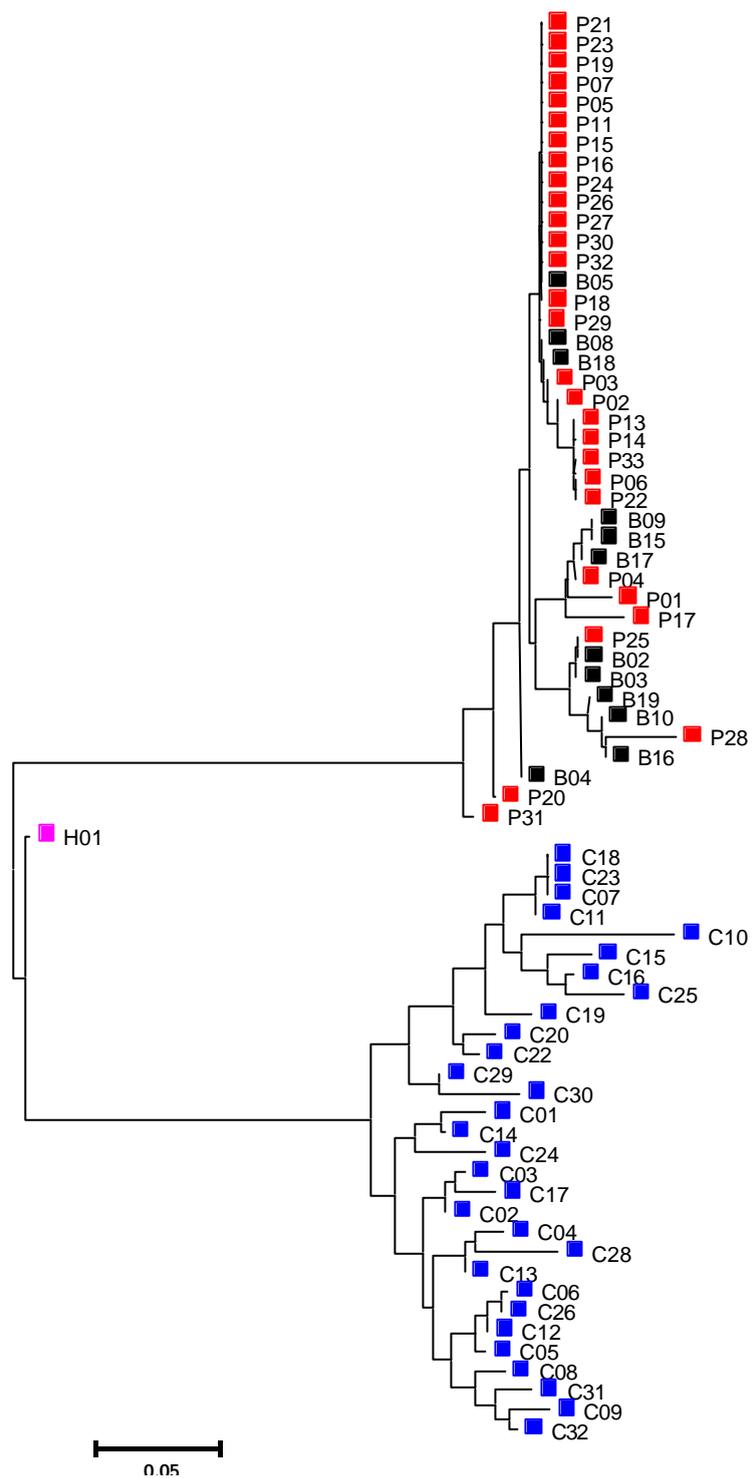
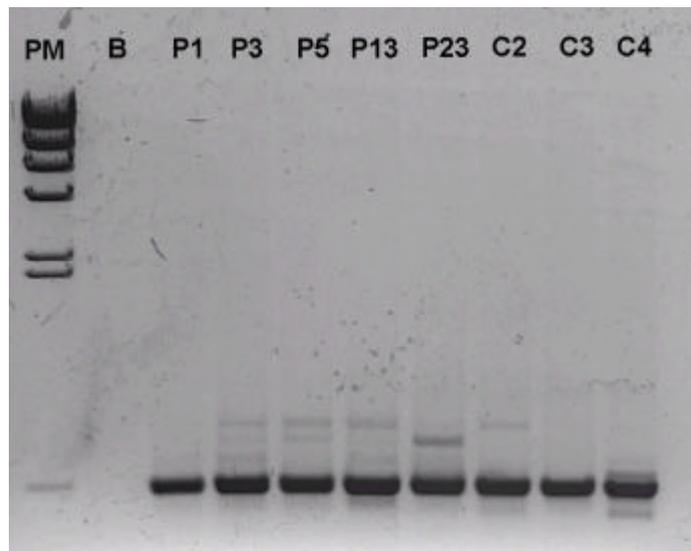


Figura 5. Dendrograma UPGMA de *Pseudoplatystoma corruscans* do rio Baía (preto), na planície alagável do alto rio Paraná, dos rios Manso e Cuiabá (vermelho), de *P. fasciatum* dos rios Manso e Cuiabá (azul) e do híbrido inter-específico (rosa), construído a partir da matriz de complementos aritméticos dos coeficientes de similaridades de Nei e Li obtidos com marcadores moleculares RAPD.

A variação na região *D-loop* (Figura 4) foi suficiente para discriminar *P. corruscans* e *P. fasciatum*, enquanto que foi insuficiente nos genes *tRNA<sup>Thr</sup>*, *tRNA<sup>Pro</sup>* e em uma seqüência parcial do *citocromo b*. Com as seqüências da região *D-loop* foram estimadas as distâncias genéticas 2-parâmetros de Kimura. A distância interespecífica foi, aproximadamente, dez

vezes maior do que as médias das estimativas intraespecíficas.

O dendrograma obtido pelo método neighbor-joining (Figura 8) demonstrou que a porção da região *D-loop* estudada acumulou polimorfismo suficiente para caracterizar e discriminar *P. corruscans* e *P. fasciatum*.



**Figura 6.** Fragmentos do DNA mitocondrial de *Pseudoplatystoma corruscans* (P1 até P23) e *P. fasciatum* (C2 a C4) coletados nos rios Manso e Cuiabá (MT). PM: padrão molecular  $\lambda$ /Hind III; B: controle sem DNA.

## Discussão

O alto grau de parentesco entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* foi revelado pela presença de bandas monomórficas RAPD e SPAR que ocorreram simultaneamente nas duas espécies. Além disso, a baixa taxa de variação nos genes *tRNA<sup>Pro</sup>* e *tRNA<sup>Thr</sup>* e na seqüência parcial do gene *cyt b* do DNA mitocondrial mostram que há proximidade genética entre as duas espécies.

Ao mesmo tempo, a divergência genética entre as espécies foi evidenciada pela ocorrência de bandas exclusivas ou espécie-específicas SPAR e RAPD. Mas, a possibilidade de cruzamento interespecífico indica que pode haver alto grau de semelhança nas constituições genéticas

das duas espécies e, conseqüentemente, baixa distância genética. A distância de Nei (1978), calculada a partir dos dados de RAPD e estimada como 0,7627 pode ser considerada alta, uma vez que as espécies em questão são pertencentes ao mesmo gênero e capazes de se cruzarem em cativeiro. De acordo com Thorpe (1982), a média de distância genética de Nei entre espécies pertencentes ao mesmo gênero é de 0,16. O índice de fixação  $F_{ST}$  0,7189, ou seja, acima de 0,25, indica que as populações estudadas estão altamente diferenciadas geneticamente. O gráfico de dispersão e o dendrograma obtidos a partir de marcadores moleculares RAPD demonstraram que existe diferenciação genética entre as duas espécies.

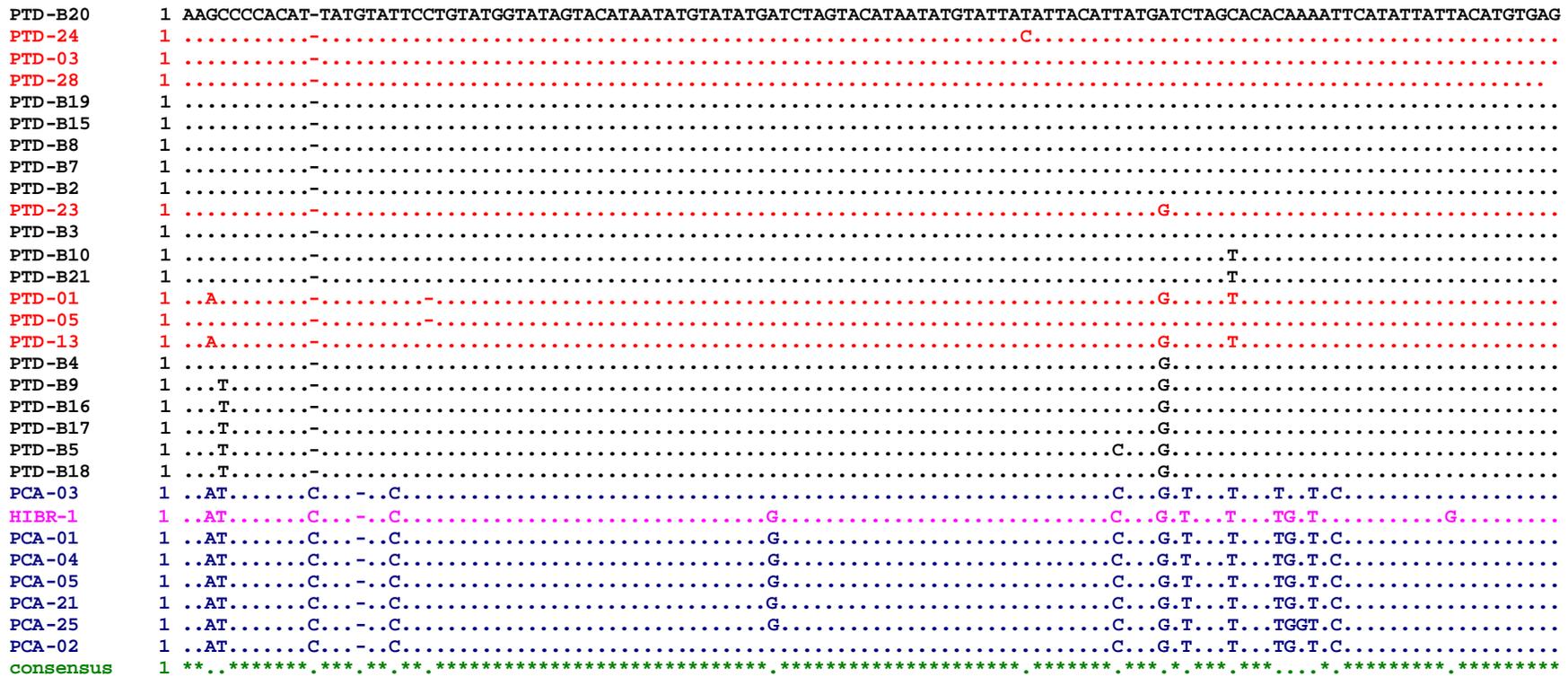


Figura 4. Alinhamento de seqüências da região controle (*D-loop*) do mtDNA de Pintado dos rios Manso e Cuiabá (vermelho) e do rio Baía (preto), de Cachara dos rios Manso e Cuiabá (azul) e do híbrido inter-específico (rosa). Em uma seqüência de 360 bp da região hipervariável *D-loop* foram encontrados 22 sítios de substituições nucleotídicas exclusivos de Cachara.

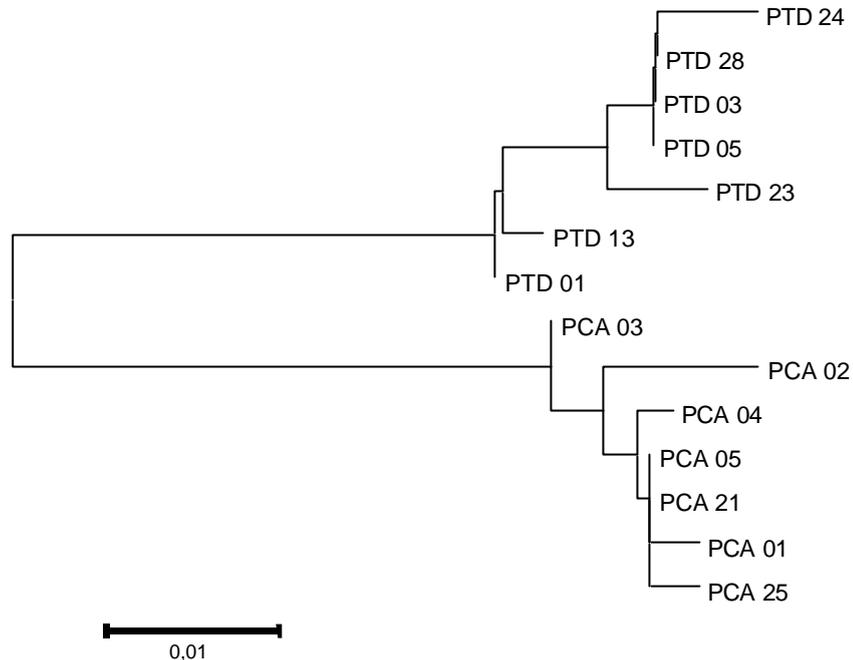


Figura 8. Dendrograma neighbor-joining para a região *D-loop* do DNA mitocondrial de *Pseudoplatystoma corruscans* (PTD) e *Pseudoplatystoma fasciatum* (PCA) do rio Manso. A distância genética foi computada com o método Kimura 2-parameters.

Como bandas espécie-específicas de pintado e de cachara não apareceram simultaneamente em um mesmo indivíduo, pode-se concluir que provavelmente a hibridização entre as duas espécies não está ocorrendo na região dos rios Cuiabá e Manso. Sabe-se que os híbridos produzidos em cativeiros são férteis, portanto, se estivessem ocorrendo na natureza estaria em andamento um processo de homogeneização genética das populações das duas espécies. O fluxo gênico intenso e/ou prolongado entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* resultaria em uma população híbrida, o que não se observa atualmente.

Atualmente, o híbrido induzido entre *P. corruscans* e *P. fasciatum* está sendo cultivado em pisciculturas na área de abrangência do alto rio Paraná, onde não ocorre naturalmente *P. fasciatum*. Evidentemente, com a manutenção de grandes quantidades do híbrido em tanques, há risco de escape para os rios dessa região.

Os marcadores RAPD e SPAR demonstraram que o peixe com

características intermediárias entre *P. corruscans* e *P. fasciatum*, recentemente capturado na planície de inundação do alto rio Paraná, é realmente resultante do cruzamento entre essas duas espécies. Nesse cruzamento, o híbrido foi gerado tendo *P. fasciatum* como mãe, considerando-se que seu DNA mitocondrial é de cachara. É de se supor que esse híbrido seja proveniente de escape de piscicultura, atingindo o alto rio Paraná. A presença de híbridos na planície alagável do alto rio Paraná representa um risco em potencial para o patrimônio genético da população de *P. corruscans*, que se reproduz no último trecho não represado do alto rio Paraná.

A alta variabilidade nas seqüências *D-loop* do DNA mitocondrial demonstrou a diferenciação genética entre as duas espécies, podendo caracterizar e discriminar *P. corruscans* e *P. fasciatum*. A distância genética estimada com base nas seqüências nucleotídicas da região *D-loop* do DNA mitocondrial foi cerca de dez vezes mais alta entre as duas espécies, comparando-se com as distâncias

intraespecíficas, ou seja, entre indivíduos da mesma espécie. O dendrograma obtido pelo método neighbor-joining demonstrou que a porção da região *D-loop* estudada acumulou polimorfismo nucleotídico suficiente para caracterizar e discriminar *P. corruscans* e *P. fasciatum*.

Desde que não estão ocorrendo cruzamentos naturais na região do rio Manso, onde há simpatria das duas espécies, as bandas espécie-específicas de RAPD e SPAR detectadas constituem marcadores diagnóstico seguros para identificação de *P. corruscans* e *P. fasciatum* e do híbrido. É urgente então, que estejam disponíveis marcadores diagnósticos. Apesar da crença que o híbrido  $F_1$  não retrocruze com *P. corruscans*, isto não está demonstrado. Há necessidade de experimentação controlada para obtenção de informação confiável a esse respeito, mas há indicações preliminares sobre a possibilidade de retrocruzamento do  $F_1$  com *P. corruscans*.

Se comprovada essa possibilidade, será real o risco de introgressão de genes de *P. fasciatum* para a população de *P. corruscans* da planície alagável do alto rio Paraná. O risco estende-se para as populações que se reproduzem nos tributários do reservatório de Itaipu. Portanto, os marcadores espécie-específicos aqui identificados poderão contribuir na avaliação e monitoramento de longo prazo da integridade genética da população residente de *P. corruscans*.

## Conclusões

- ? A distância genética de Nei (1978) estimada foi 0,7627, que pode ser considerada alta, uma vez que as espécies produzem híbridos.
- ? Marcadores RAPD e SPAR foram suficientes para discriminar as duas espécies e identificar híbridos.
- ? A região *D-loop* evidenciou a diferenciação genética entre as espécies.
- ? Não há evidência de hibridização natural das duas espécies.

- ? O híbrido, encontrado na planície alagável do alto rio Paraná, foi gerado em cruzamento tendo *P. fasciatum* como fêmea e deve ser proveniente de escape de piscicultura.
- ? A presença de híbridos na planície alagável do alto rio Paraná representa um risco em potencial para o patrimônio genético da população de *P. corruscans*, que se reproduz no último trecho não represado do alto rio Paraná.
- ? Os marcadores espécie-específicos aqui identificados poderão contribuir na avaliação e monitoramento de risco de introgressão de genes do híbrido para a população *P. corruscans*.

## Referências

- ALBERT, J., FERNANDES-MATIOLI, F.M.C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.. A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Telostei) from Southeastern Brazil: towards the deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia* 1: 85-102. 1999.
- BIELAWSKI, JP., PUMO, .D.E. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity* 78: 32-40. 1997.
- CACCONE, A.; ALLEGRUCCI, G.; FORTUNATO, C. SBORDONI, V. Genetic differentiation within the european sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. *Journal of Heredity* 88: 316-324. 1997.
- CALLEJAS, C., OCHANDO, M.D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology* 53: 208-215. 1998.
- ELO, K.; IVANOFF, S.; VUORINEN, J.A.; PIIRONEN, J. Inheritance of RAPD markers and detection of hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture* 152: 55-65. 1997.
- KUUSIPALO, L. Genetic differentiation of endemic Nile perch *Lates stappersi* (Centropomidae, Pisces) population in Lake Tanganyika suggested by RAPD markers. *Hydrobiologia* 407: 141-148. 1999.
- MARQUES, E. E. Biologia Reprodutiva,

alimentação natural e dinâmica da nutrição do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto rio Paraná. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 104 p. 1993.

MEYER, A.; KOCHER, T.D., BASASIBWAKI P *et al.* Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347: 550-553. 1990.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M., PAÇÓ –LARSON, M, L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hígida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 10: 559-569. 1998.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590. 1978.

PETRERE Jr, M. A pesca de água doce no Brasil. *Ciência Hoje* 19: 28-33. 1995.

REZENDE, E.K.; CATELLA, A.C.; NASCIEMENTO, F.L.; PALMEIRA, S.S.; CANDIDO, R.A.; LIMA, M.S.; ALMEIDA, V.L.L. Biologia do Curimbatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrogáfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP. Boletim de Pesquisa 2. 75p. 1996.

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; SALLUM, W.B. GODINHO, H.P. Indução experimental da desova do surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: Miranda, M.O.T. (org). *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA. P. 69-79 (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19). 1997.

THORPE, J.P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13: 139-168. 1982.

WELCOMME, R.L. *River fisheries*. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, Roma. 330 p. (FAO Fisheries Technical Paper, 262). 1985.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535. 1990.