

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**

**Jussara Oliveira Vaini**

**IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO  
GENÉTICA DO SURUBIM HÍBRIDO  
INTERESPECÍFICO (*Pseudoplatystoma corruscans* X  
*Pseudoplatystoma reticulatum*) EM AMBIENTE  
NATURAL DO ESTADO DO MATO GROSSO DO  
SUL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS  
FEVEREIRO/2013**

**Jussara Oliveira Vaini**

**IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO  
GENÉTICA DO SURUBIM HÍBRIDO  
INTERESPECÍFICO (*Pseudoplatystoma corruscans* X  
*Pseudoplatystoma reticulatum*) EM AMBIENTE  
NATURAL DO ESTADO DO MATO GROSSO DO  
SUL**

**Orientadora: Dr. Alexéia Barufatti Grisolia  
Co-orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti**

**Dissertação de mestrado  
submetida ao programa de  
pós-graduação em Ciência e  
Tecnologia Ambiental, como  
um dos requisitos necessários  
para a obtenção do título de  
mestre em Ciência e  
Tecnologia na área de  
concentração Ciência  
Ambiental.**

**DOURADOS/MS  
FEVEREIRO/2013**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD**

597.098171 Vaini, Jussara Oliveira.  
V131i Identificação de contaminação genética do surubim híbrido interespecífico (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) em ambiente natural do Estado do Mato Grosso do Sul / Jussara Oliveira Vaini – Dourados-MS : UFGD, 2013.  
30 f.

Orientadora: Profa. Dra. Alexéia Barufatti Grisolia.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Surubim – Mato Grosso do Sul. 2. Peixe híbrido.  
I. Título.



## Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Identificação de Contaminação Genética do Surubim Híbrido Interespecífico (*Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*) em Ambiente Natural do MS**”, de autoria de **Jussara Oliveira Vaini**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

---

Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia  
(Orientadora-UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora

---

Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz  
Membro Examinador (UEMS)

---

Profa. Dra. Márcia Regina Russo  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 15 de fevereiro de 2013.

**Dedico este trabalho aos meus pais Vanderlei e Judite, e à minha irmã Vanessa, pelo apoio, dedicação e amor incondicional que sempre me proporcionaram, sendo essenciais para minha formação tanto pessoal quanto profissional.**

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados por me proporcionar essa oportunidade de capacitação.

Ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal da Faculdade de Ciências Agrárias – UFGD pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho. E na oportunidade um agradecimento ao coordenador do laboratório Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno pela confiança em mim depositada para a realização das atividades práticas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

A Profa. Dra. Alexéia Barufatti Grisolia pela oportunidade, apoio, orientação e confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti, pela co-orientação, incentivo e por gentilmente ter me recebido em seu laboratório de Genética de Peixes da UNESP campus de Bauru/SP para a realização de parte das análises do projeto. E na ocasião um agradecimento à equipe do seu laboratório (Tatiana, Bruna, Sandro, Rosângela, Andréa, Sarah, Manolo, Larissa) pela receptividade e carinho, e em especial à Fernanda Dotti do Prado, pela sua grande contribuição que foi de extrema importância para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Celso Benites da UFMS campus de Campo Grande, pelo auxílio na padronização do método de extração de DNA, pela recepção em seu laboratório, pela gentileza e exemplo de humildade.

Ao Prof. Dr. Fábio Edir dos Santos Costa da UEMS-Dourados/MS pelo fornecimento de material biológico e ao Mestre Vitor Simão Galletti da UNIPAR-Paranaíba/PR, também pela disponibilização do material biológico, pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pelos momentos de conversa e descontração, que me possibilitaram maior aproximação com a ecologia de peixes.

Ao Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez da UEMS-Dourados/MS e sua equipe, onde pude aprender melhor sobre os métodos de coleta.

Ao Gestor Ambiental Paulo André Poliano Valejo e sua mãe a Presidente da Colônia de Pescadores Artesanais Profissionais “Z-10” de Fátima do Sul, dona Maria Antônia Poliano, que possibilitaram-me o contato direto com os pescadores da região, para que eu pudesse explicar o projeto, e solicitar dos mesmos sua colaboração na aquisição de material biológico e monitoramento dos rios. Tornando-se para mim não só exemplo de profissionais preocupados com a conservação da fauna de peixes, mas também exemplo de humildade e companheirismo. E um agradecimento a todos os pescadores amadores ou profissionais que colaboraram voluntariamente na coleta do material biológico.

Ao Thiago Tetsuo Ushizima, gerente de produção da Piscicultura Mar&Terra da cidade de Itaporã/MS, pelo apoio durante o projeto e pelos exemplares de peixes fornecidos para a realização deste trabalho.

A todos os amigos que estão presentes ou já passaram pelo laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal da UFGD: Bruno, Lara, Danielly, Alexandre, André, Joyce, Jéssica e Adrielle, obrigada por toda a ajuda durante a realização deste trabalho, pelos conselhos, paciência, carinho, amizade, brincadeiras, pelos momentos de descontração e pelas risadas durante as viagens para os eventos científicos. Vocês foram e continuam sendo de grande importância para minha vida.

Aos meus colegas da pós-graduação que de maneira direta ou indireta compartilharam comigo essa convivência científica, em especial à Tatiane Teixeira pelos momentos de conversa, incentivo e ensinamento de vida, um exemplo de guerreira.

Um agradecimento mais que especial é aos meus pais Vanderlei, Judite e à minha irmã Vanessa que nunca mediram esforços para que eu continuasse sempre estudando, por toda a confiança a mim depositada, pelo amor incondicional, amizade, educação, paciência, pelas palavras de consolo, de perseverança, pelos conselhos e incentivo em lutar pelos meus sonhos. Obrigada por tudo, vocês são tudo para a minha vida, nenhuma palavra seria o suficiente para descrevê-los, amo vocês.

## LISTA DE TABELAS

| <u>Tabela</u> | <u>Legenda</u>   | <u>Página</u> |
|---------------|--|---------------|
| 1             | Descrição dos primers universais e espécie-específicos; Temperatura de anelamento (Ta) em °C; Tamanho do fragmento em pares de bases (pb) utilizados nas reações de amplificação                         | 18            |
| 2             | Descrição das enzimas de restrição e do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) gerados pela digestão enzimática. Pc: <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , Pr: <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> | 19            |
| 3             | Comparação entre a identificação fenotípica e genotípica dos indivíduos em cada local de coleta  | 21            |
| 4             | Exemplos de caracterização fenotípica e genotípica resultantes das análises  | 22            |

## LISTA DE FIGURAS

| <u>Figura</u> | <u>Legenda</u>   | <u>Página</u> |
|---------------|--|---------------|
| 1             | Mapa ilustrativo dos locais utilizados para coleta do material biológico pertencentes à Bacia do Paraná (Rio Dourados, Rio Brilhante, Rio Ivinhema) e Bacia do Paraguai (Rio Negro, Rio Aquidauana, Rio Miranda, Rio Paraguai) (Adaptado de Miranda, 2005) | 15            |

## SUMÁRIO

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL.....   | 01 |
| 2 OBJETIVOS .....         | 04 |
| 3 RESULTADOS .....        | 05 |
| 4 REFERÊNCIAS .....       | 06 |
| Capítulo I .....          | 09 |
| Resumo .....              | 10 |
| Abstract.....             | 11 |
| Introdução .....          | 12 |
| Materiais e Métodos ..... | 14 |
| Resultados .....          | 20 |
| Discussão .....           | 22 |
| Conclusão.....            | 26 |
| Agradecimentos.....       | 26 |
| Referências .....         | 27 |
| 5 CONCLUSÃO GERAL.....    | 30 |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade de vertebrados do mundo e há indícios de que somente na América do Sul e Central ocorram mais de 8.000 espécies (Winemiller et al. 2008). O Brasil, caracterizado por grandes bacias hidrográficas, conta com numerosa e diversificada fauna de peixes (Marengoni et al. 2006). No Estado do Mato Grosso do Sul, dentre as espécies de peixes com maior valor econômico, destacam-se *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) e *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), amplamente conhecidos como surubins, pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma*, família Pimelodidae e ordem dos Siluriformes (Romagosa et al. 2003).

As espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* desempenham importante papel ecológico (sendo grande predador) e econômico (carne saborosa e sem espinho intramuscular) (Carvalho et al. 2008).

O custo para a produção de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* é alto, isso deve-se a falta de informações zootécnicas sobre essas espécies, que são necessárias para aprimorar as técnicas de reprodução, manejo durante a fase de criação, e nutrição (Theodoro, 2004).

Com o intuito de obter melhoria na produtividade a partir da heterose, visando obter melhor aceitação por parte dos produtores e consumidores, os produtores de pintado desenvolveram o surubim híbrido interespecífico (cruzamento entre *P. corruscans* e *P. reticulatum*). Entretanto, com a falta de fiscalização, de manejo adequado e de mecanismos de identificação das espécies nas estações de criação, os surubins híbridos interespecíficos estão sendo introduzidos no ambiente natural (Porto-Foresti et al. 2008).

Os resultados dos riscos genéticos apresentados por híbridos interespecíficos de peixes são de difícil previsão e dependem basicamente dos graus de viabilidade, desempenho e capacidade dos híbridos se reproduzirem na natureza, podendo ocasionar desequilíbrios ecológicos. Se forem estéreis, podem competir por recursos ambientais com a ictiofauna nativa, se forem parcialmente ou totalmente férteis podem retrocruzar e causar introgressão gênica, fato que pode diminuir a diversidade genética e causar a extinção das espécies parentais selvagens (Marques, 2002; Porto-Foresti et al. 2008).

O escape do surubim híbrido interespecífico para o ambiente natural, juntamente com a possibilidade de retrocruzamento e introgressão gênica, gera indivíduos Pós-F<sub>1</sub> que se assemelham tanto com os híbridos F<sub>1</sub> quanto com os parentais. Com isso, a identificação dos híbridos somente por características morfológicas não é segura (Toledo-Filho et al. 1994).

A identificação incorreta do híbrido e de seus parentais puros pode gerar problemas tanto em ambientes naturais (contaminação genética dos estoques selvagens) quanto em pisciculturas (diminuição da produtividade de alevinos viáveis, devido utilização de matrizes híbridas ao invés de puras) (Porto-Foresti et al. 2008). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento e a aplicação de metodologias eficientes que permitam a correta identificação e diferenciação do híbrido e puro (Marques, 2002; Porto-Foresti et al. 2011).

As técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) multiplex com oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos (Taris et al. 2005) e PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction*) foram desenvolvidas com o objetivo de identificar espécies puras e híbridos (Hashimoto et al. 2010).

Os principais genes empregados para diferenciação entre *P. corruscans*, *P. reticulatum* e identificação de seus híbridos interespecíficos recíprocos F<sub>1</sub> e pós-F<sub>1</sub>, de acordo com Prado et al. (2011) e Hashimoto et al. (2012) são: os nucleares RAG2 (*Recombination Activating Gene*), GLOB (*β-globin*), EF1α (*Elongation Fator 1-alpha*), 18S rRNA (*Ribosomal RNA*) e o mitocondrial 16S rRNA (*Ribosomal RNA*).

Diante do exposto, objetivou-se identificar o surubim híbrido interespecífico (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) em ambiente natural do Estado do Mato Grosso do Sul, determinar sua linhagem materna, verificar se a identificação morfológica corresponde à identificação genética, avaliar a eficiência das ferramentas moleculares tanto para os programas de conservação e melhoramento genético das espécies puras, quanto para os planos de manejo em pisciculturas e em ambientes naturais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

➤ Identificar contaminação genética dos surubins híbridos interespecíficos (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) em rios do Estado do Mato Grosso do Sul

### 2.2 Específicos

➤ Determinar a linhagem materna dos híbridos, ou seja, se são “Cachapinta” (fêmea de cachara e macho de pintado) ou “Pintachara” (fêmea de pintado e macho de cachara);

➤ Identificar se a caracterização fenotípica, baseada em métodos morfológicos, corresponde à identificação genotípica, fornecida pelos marcadores moleculares;

➤ Avaliar a potencialidade das ferramentas moleculares para os planos de manejo tanto em pisciculturas quanto em ambientes naturais.

### **3 RESULTADOS**

“O resultado e a discussão dos dados obtidos nas análises moleculares encontram-se apresentados na forma de capítulo. O capítulo I foi apresentado de acordo com as normas da revista, descritas no Anexo I. As referências citadas na introdução da dissertação estão discriminadas no item 4 Referências”.

#### **CAPÍTULO I – IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DO SURUBIM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO F<sub>1</sub> E PÓS-F<sub>1</sub> (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) EM RIOS DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

#### 4 REFERÊNCIAS

Carvalho DC, Seerig A, Melo DC, Sousa AB, Pimenta D, Oliveira DAA (2008) Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma spp.*). Rev Bras Reprod Anim. 32(4):215-219

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. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.015

Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012) Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. Aquaculture Research 1-9. doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03092.x

Marengoni NG, Machado MRF, Gasparino E (2006) Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. Semina: Ciências Agrárias 27(1):99-106

Marques DKS (2002) Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. Embrapa Pantanal, Corumbá

Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Alves AL, Almeida RBC, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F (2008) Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genet Mol Biol* 31(1):195-202. doi: 10.1590/S1415-47572008000200005

Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F (2011) A hibridação interespecífica em peixes. *Panorama da Aquicultura* 21(126):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*. *Aquaculture Research* 42:1890-1894. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02777.x

Romagosa E, Paiva P, Andrade-Talmelli EF, Godinho HM (2003) Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae), mantidas em cativeiro. *Bol Inst Pesca* 29(2):151-159

Taris N, Baron S, Sharbel T, Sauvage C, Boudry P (2005) A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high throughput parentage analyses in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research* 36(5):516-518. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01208.x

Theodoro ACM (2004) Efeito de peso e de sexo sobre as características de processamento de surubins (*Pseudoplatystoma* sp.) cultivados. Dissertação, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Bernardinho G, Calcagnotto D (1994) Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. USP, São Paulo

Winemiller KO, Agostinho AA, Caramaschi PE (2008) Fish ecology in tropical streams. In: Dudgeon D (ed) Tropical Stream Ecology. Academic Press, California, pp 107-146

## CAPÍTULO I

### **IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DO SURUBIM HÍBRIDO INTERESPECÍFICO F<sub>1</sub> E PÓS-F<sub>1</sub> (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) EM RIOS DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

**Identificação genética do Surubim híbrido interespecífico F<sub>1</sub> e Pós-F<sub>1</sub>  
(*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) em rios do Estado  
do Mato Grosso do Sul, Brasil**

**Jussara Oliveira Vaini<sup>1</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>2</sup>, Fábio Porto-Foresti<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Brasil. e-mail: jussaravaini@hotmail.com

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Bauru, Brasil

**Resumo** O híbrido interespecífico entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* é amplamente comercializado por apresentar maior docilidade e precocidade quando comparado aos parentais. Porém, dificuldade de identificação incorreta dos híbridos e puros associada aos escapes destes pelas pisciculturas possibilitou a introdução de surubins híbridos em ambientes naturais. Com isso, objetivou-se identificar, por meio de técnicas moleculares, a existência de surubins híbridos em rios do Estado do Mato Grosso do Sul. Os peixes (*P. corruscans*, *P. reticulatum* e surubim híbrido) foram coletados e identificados visualmente por pescadores e pesquisadores. Fragmentos de nadadeira de 183 peixes provenientes do Rio Dourados, Ivinhema, Brilhante (Bacia do Paraná), Negro, Aquidauana, Miranda, Paraguai (Bacia do Paraguai) foram utilizados. O DNA total foi extraído com Resina Chelex 5% e submetido a PCR multiplex e PCR-RFLP dos genes nucleares RAG2, GLOBINA, EF1 $\alpha$ , 18S rRNA e mitocondrial 16S rRNA. Do total de 33 peixes coletados na Bacia do Paraguai, foram detectados 10 *P. corruscans*, 14 *P. reticulatum*, 7 Híbridos F<sub>1</sub> e 2 Híbridos Pós-F<sub>1</sub>, todos “Pintacharas”. Dos 150 peixes da Bacia do Paraná, identificou-se 66 *P. corruscans*, 2 *P. reticulatum*, 61 Híbridos F<sub>1</sub> e 21 Híbridos Pós-F<sub>1</sub>, sendo 18 “Pintacharas” e 64 “Cachapintas”. Os resultados demonstraram que a

identificação visual não correspondeu com a identificação genética e que a técnica molecular empregada foi eficiente, pois foi possível a identificação do híbrido e seus parentais puros. A implantação de projetos de manejo e conservação torna-se necessária, a fim de manter a integridade genética dessas populações em rios do Estado do Mato Grosso do Sul.

**Palavras-chave** Conservação, Hibridação, Marcadores moleculares, Siluriformes.

**Abstract** The interspecific hybrid between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* is widely marketed for presenting higher docility and precocity compared to the parents. But the incorrect identification of hybrids and pure, with these leaks by fish farms, introduced the surubins hybrids in natural environments. The aim of this research was identify, by means of molecular techniques, the existence of surubins hybrids in rivers of the State of Mato Grosso do Sul. The fishes (*P. corruscans*, *P. reticulatum* and surubin hybrid) were collected and identified visually by fishermen and researchers. Fin fragments of 183 fishes from Dourados, Ivinhema, Brilhante (Parana Basin), Negro, Aquidauana, Miranda, Paraguay (Paraguay Basin) were used. Total DNA was extracted with 5% Chelex Resin, performed multiplex-PCR and PCR-RFLP of RAG2, GLOBINA, EF1 $\alpha$ , 18S rRNA nuclear genes and 16S rRNA mitochondrial. It was observed that among the 33 fishes that were collected in the Paraguay Basin, 10 were identified *P. corruscans*, 14 *P. reticulatum*, 7 Hybrids F1 and 2 Hybridys Post-F1, "Pintacharas." Already of 150 fishes of the Parana Basin, 66 were identified *P. corruscans*, 2 *P. reticulatum*, 61 Hybrids F1 and 21 Hybrids Post-F1, this 18 "Pintacharas" and 64 "Cachapintas". The results demonstrated that visual

identification not did match with the genetic identification and molecular technique that was efficient, because it was possible to identify the hybrids and pures parentals. The implementation of project of management and conservation is necessary to maintain the genetic integrity of these populations in rivers of the State of Mato Grosso do Sul.

**Keywords** Conservation, Hybridization, Molecular markers, Siluriformes.

## **Introdução**

Matrizes de *P. corruscans* e *P. reticulatum* estão sendo utilizadas para realizar a técnica de hibridação em cativeiro e o resultado deste cruzamento é o surubim híbrido interespecífico “Cachapinta” (fêmea *Pseudoplatystoma reticulatum* e macho *Pseudoplatystoma corruscans*), ou “Pintachara” (fêmea *Pseudoplatystoma corruscans* e macho *Pseudoplatystoma reticulatum*) (Porto-Foresti et al. 2011). Entre as vantagens do cruzamento interespecífico destacam-se o menor custo, a precocidade e a docilidade dos híbridos quando comparado aos puros (Carvalho et al. 2008).

Entretanto, devido a falta de mecanismos de identificação das espécies, de fiscalização e manejo adequado dos produtos, os híbridos podem ser confundidos com seus parentais e serem introduzidos em ambientes naturais por meio de escapes de tanques de pisciculturas ou estações de criação e “pesque-pagues” (Porto-Foresti et al. 2008; Hashimoto et al. 2012a).

O escape do surubim híbrido interespecífico para o ambiente natural, juntamente com a falta de mecanismos para sua identificação, pode diminuir a diversidade genética

das espécies parentais puras, pois o híbrido é fértil, podendo assim retrocruzar com os parentais puros e causar introgressão gênica (Marques, 2002; Porto-Foresti et al. 2008; Hashimoto et al. 2012b).

No Brasil, pesquisas já revelaram a existência dos surubins híbridos em rios e a sua comercialização como reprodutores “puros” (Carvalho et al. 2008; Hashimoto et al. 2012b). Esse fato indica que cuidados devem ser tomados na utilização destes animais, pois podem tanto conduzir resultados positivos na piscicultura brasileira, incrementando o desempenho, como podem causar impactos nos estoques naturais, reduzindo a biodiversidade, bem como influenciar na perda do nativo puro como recurso genético para estabelecimento do cruzamento para produção do híbrido interespecífico (Carvalho et al. 2008; Porto-Foresti et al. 2011).

Considerando-se que a identificação visual por características morfológicas não é uma ferramenta segura para identificação dos híbridos, torna-se relevante a utilização de técnicas moleculares que possibilitem o diagnóstico de peixes híbridos e diferenciação das espécies parentais, (Toledo-Filho et al. 1994).

Prado et al. (2012a) realizaram PCR multiplex e PCR-RFLP do gene nuclear RAG2 (*Recombination Activating Gene*) e mitocondrial 16S rRNA (*Ribossomal RNA*) em indivíduos provenientes do ambiente natural e identificaram a ocorrência de surubins híbridos interespecíficos F<sub>1</sub> “Pintachara” e “Cachapinta”. Segundo os autores, este fato, possivelmente, pode ter ocorrido devido escapes dos híbridos dos tanques de pisciculturas ou “pesque-pagues” da região, indicando possibilidade de contaminação do ambiente natural com animais oriundos de cultivo estar acontecendo em algumas regiões brasileiras. O acréscimo dos marcadores moleculares nucleares GLOB (*β-globin*), EF1α (*Elongation Fator 1-alpha*) e 18S rRNA (*Ribossomal RNA*) possibilitou a

identificação genética de surubins híbridos interespecíficos Pós-F<sub>1</sub> (Hashimoto et al. 2012b).

Portanto, torna-se clara a aplicabilidade dessas ferramentas moleculares na identificação de espécies componentes das linhagens parentais em condições naturais e de cultivo, no monitoramento dos surubins híbridos em estoques naturais e cultivados, bem como em programas de conservação e melhoramento genético de *P. corruscans* e *P. reticulatum* (Hashimoto et al. 2012b; Prado et al. 2012a).

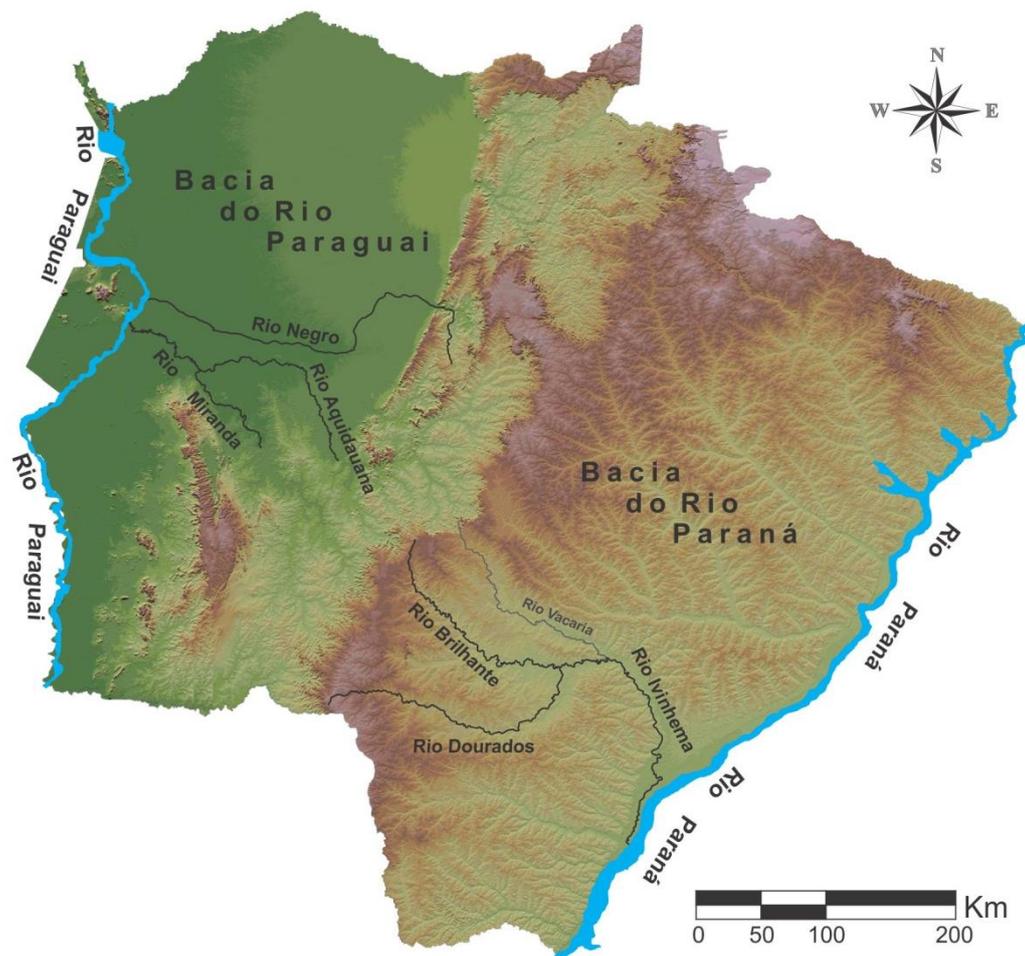
Com isso, objetivou-se identificar a presença do surubim híbrido interespecífico resultante do cruzamento entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* em rio do Estado do Mato Grosso do Sul - Brasil, determinar a linhagem materna dos híbridos (“Cachapinta” ou “Pintachara”), verificar se a identificação baseada em caracteres fenotípicos corresponde à identificação genética-molecular, avaliar a potencialidade das ferramentas moleculares tanto para os programas de conservação e melhoramento genético das espécies puras quanto para os planos de manejo em pisciculturas e em ambientes naturais.

## **Materiais e métodos**

### Material biológico e locais de coleta

Fragmentos de nadadeira caudal de 183 peixes (*P. corruscans*, *P. reticulatum* e Surubim híbrido interespecífico) foram coletados no período de setembro de 2007 a agosto de 2008 e março de 2011 a março de 2012 por pesquisadores e pescadores amadores/profissionais associados à Colônia de Pescadores Artesanais Profissionais “Z-10” de Fátima do Sul/MS. Os peixes foram provenientes dos seguintes locais: Rio

Dourados (n= 90), Rio Ivinhema (n= 49), Rio Brilhante (n= 11), pertencentes à Bacia do Paraná; e no Rio Negro (n= 17), Rio Aquidauana (n= 7), Rio Miranda (n= 7), Rio Paraguai (n= 2), pertencentes à Bacia do Paraguai (Fig. 1). O material biológico foi armazenado em microtubos contendo álcool 95% e armazenado em freezer a -20°C até o processamento.



**Fig. 1** Mapa ilustrativo dos locais utilizados para coleta do material biológico pertencentes à Bacia do Paraná (Rio Dourados, Rio Brilhante, Rio Ivinhema) e Bacia do Paraguai (Rio Negro, Rio Aquidauana, Rio Miranda, Rio Paraguai) (Adaptado de Miranda, 2005)

## Extração e quantificação do DNA

O DNA total foi extraído no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) – Brasil/MS, seguindo o protocolo utilizando resina Chelex 5% - Chelex® 100 (Bio-Rad) e armazenado em freezer (-20<sup>0</sup>C) até o seu processamento.

A pureza (260nm/280nm) e a concentração (em ng/μL) do DNA total foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoPhotometer™ P-300 UV-Vis da IMPLEN®).

## Reações de PCR multiplex

As sequências dos oligonucleotídeos (primers) universais e espécie-específicos utilizados, bem como a temperatura de anelamento e o tamanho dos fragmentos gerados, foram descritos na Tabela 1.

As reações de PCR multiplex utilizadas foram as desenvolvidas por Prado et al. (2011) para o gene nuclear RAG2 e mitocondrial 16S rRNA, e por Hashimoto et al. (2012b) para os genes nucleares GLOB e EF1  $\alpha$ . Já para o gene 18S rRNA realizou-se somente PCR-RFLP, pois segundo os autores citados a cima, não foi possível desenhar o primer multiplex para esse gene que pudesse diferenciar as espécies de peixes estudadas.

A PCR multiplex dos genes nucleares (RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$ ) e do gene mitocondrial 16S rRNA foi realizada em um volume final de 25 μL e a mistura para amplificação de cada gene constituiu-se de: 4,9μL de água ultra-pura (Fermentas®), 10

pmoles de cada primer universal e espécie-específico, 1U  $\mu$ L da Taq DNA Polimerase (1U/ $\mu$ L), 12,5  $\mu$ L do MIX de PCR Master (Fermentas®) e 10-50ng do DNA total.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador da BIORAD modelo MyCycler™ Thermal Cycler. O protocolo utilizado para as reações de amplificação multiplex foi adaptado de Prado et al. (2011) e Hashimoto et al. (2012 b), sendo constituído dos seguintes passos para a PCR multiplex do gene RAG2 e 16S: um ciclo de 95°C por 5 min; um ciclo de 95°C por 30s, 58°C por 45s, 72°C por 20s, com um total de 30 repetições; e um ciclo final de 72°C por 5 min. Para a PCR multiplex dos genes GLOB e EF1 $\alpha$  variaram apenas as temperaturas de anelamento, que foram de 59°C e 50°C para cada um dos genes respectivamente. As reações de amplificação foram visualizadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (10mg/mL) e visualizadas em fotodocumentador (UVP®, PhotoDoc-It 55).

**Tabela 1** Descrição dos primers universais e espécie-específicos; Temperatura de anelamento (Ta) em °C; Tamanho do fragmento em pares de bases (pb) utilizados nas reações de amplificação

|                            | Primer                           | Sequência (5'-3')              | Ta (°C) | Tamanho (pb) | Referência               |                          |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------|--------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Universais</b>          | RAG2<br>SiluF                    | CCTGAGTGCTACCTTATT<br>CATGGA   | 50°C    | 550          | (Prado et al. 2011)      |                          |
|                            | RAG2<br>SiluR                    | CTTGGGAGGAAGAGACC<br>ATC       |         |              |                          |                          |
| <b>Espécie-específicos</b> | RAG2<br>PcR*                     | AACTCCAGGTCAATGAG<br>ATAAATG   | 58°C    | 330          |                          |                          |
|                            | RAG2<br>PrR <sup>∇</sup>         | CAGTTCCAGGTCTCTGTG<br>GTT      |         | 290          |                          |                          |
| <b>Universais</b>          | GLOB<br>SiluF                    | TCAATATGGTTCCTGG<br>ACAGA      | 55°C    | 569          |                          | (Hashimoto et al. 2012b) |
|                            | GLOB<br>SiluR                    | CCAAGAAGCTGAAAGTA<br>GACAGT    |         |              |                          |                          |
| <b>Espécie-específicos</b> | GLOB<br>PcR*                     | CAGCCACCTTGGGGTTT<br>CCT       | 59°C    | 304          |                          |                          |
|                            | GLOB<br>PrF <sup>∇</sup>         | GGTACGTCTAATCTCAG<br>TAATTGAAA |         | 137          |                          |                          |
| <b>Universais</b>          | EF1 $\alpha$ F                   | ATTGGAACTGTACCTGT<br>GG        | 50°C    | 800          | (Hashimoto et al. 2012b) |                          |
|                            | EF1 $\alpha$ R                   | CAGCCTTCTGTGCAGAC<br>TT        |         |              |                          |                          |
| <b>Espécie-específicos</b> | EF1 $\alpha$<br>PcR*             | CAACAATGGCAGCATCT<br>CCT       |         | 520          |                          |                          |
|                            | EF1 $\alpha$<br>PrR <sup>∇</sup> | ATAAAGGACAAGGACAA<br>GATCG     |         | 630          |                          |                          |
| <b>Universais</b>          | 16SF                             | ACGCCTGTTTATCAAAA<br>ACAT      | 50°C    | 650          |                          | (Prado et al. 2011)      |
|                            | 16SR                             | CGGTCTGAACTCAGATC<br>ACGT      |         |              |                          |                          |
| <b>Espécie-específicos</b> | 16S<br>PcF*                      | TGACCATAAAGATCCGG<br>CTAT      | 58°C    | 200          |                          |                          |
|                            | 16S<br>PrR <sup>∇</sup>          | TCTTGTTTTGGGGTTGT<br>TA        |         | 400          |                          |                          |
| <b>Universais</b>          | 18S<br>NS1                       | GTAGTCATATGCTTGTCT<br>C        | 50°C    | 350          | (Hashimoto et al. 2012b) |                          |
|                            | 18S<br>SiluR                     | CCATCGAAAAGTTGATA<br>GGG       |         |              |                          |                          |

\*Específico para *P. corruscans*; <sup>∇</sup> Específico para *P. reticulatum*

## Reações de PCR-RFLP

A PCR-RFLP foi realizada somente para confirmação de resultados duvidosos da PCR multiplex. A reação de PCR de cada gene seguiu com seus respectivos primers universais (Tabela 1). Os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas de restrição (Tabela 2) todas em um volume final de 8 $\mu$ L, sendo 4 $\mu$ L do produto da PCR, 2,7 $\mu$ L de água ultra-pura, 0,8 $\mu$ L do buffer da enzima (1X) e 0,5 $\mu$ L da enzima de restrição (10 U/ $\mu$ L). As reações enzimáticas ocorreram de acordo com a temperatura ideal de cada enzima por 1 hora, conforme instruções do fabricante de cada enzima. As reações de digestão foram aplicadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (10mg/mL) e visualizadas em fotodocumentador (UVP®, PhotoDoc-It 55).

**Tabela 2** Descrição das enzimas de restrição e do tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) gerados pela digestão enzimática. Pc: *Pseudoplatystoma corruscans*, Pr: *Pseudoplatystoma reticulatum*

| Gene                          | Enzima de restrição | Tamanho do fragmento em pb |                | Referência             |
|-------------------------------|---------------------|----------------------------|----------------|------------------------|
|                               |                     | Pc                         | Pr             |                        |
| <b>RAG2</b>                   | Sau96I              | 300 e 250                  | 550            | Prado et al. 2011      |
| <b>GLOB</b>                   | HpyAV               | 186 e 381                  | 569            | Hashimoto et al. 2012b |
| <b>EF1<math>\alpha</math></b> | BpmI                | 240 e 560                  | 240, 270 e 290 | Hashimoto et al. 2012b |
| <b>18S</b>                    | SmaI                | 163 e 187                  | 350            | Hashimoto et al. 2012b |
| <b>16S</b>                    | SmI                 | 650                        | 330 e 350      | Prado et al. 2011      |

## Identificação visual e identificação genética

O teste exato de FISHER foi utilizado para analisar, estatisticamente, se a identificação visual baseada em caracteres morfológicos, descrita pelos pescadores e/ou pesquisadores, correspondia à identificação genética-molecular. A análise foi realizada a partir de uma tabela de contingência com nível de significância  $\alpha$  fixado em 5%.

## Resultados

Do total de 183 exemplares analisados, 123 foram inicialmente identificados visualmente (fenotipicamente) como *P. corruscans*, 44 *P. reticulatum* e 16 surubins híbridos interespecíficos. Porém, na identificação genética, por meio dos marcadores moleculares dos genes nucleares RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$ , 18S rRNA, e do gene mitocondrial 16S rRNA, foram identificados 76 como *P. corruscans*, 16 como *P. reticulatum*, e 91 como surubins híbridos (68 híbridos F<sub>1</sub> e 23 híbridos Pós-F<sub>1</sub>) (Tabela 3). Ou seja, a identificação visual dos animais não coincidiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) com a identificação genotípica. Este resultado mostra que a identificação baseada em caracteres fenotípicos não é o parâmetro mais indicado para caracterizar os animais.

Entre os surubins híbridos interespecíficos analisados geneticamente, a maioria foi identificada como “Cachapinta” na Bacia Hidrográfica do Paraná, e “Pintachara” na Bacia Hidrográfica do Paraguai (Tabela 3).

Os indivíduos foram considerados “puros” quando apresentaram padrão de *P. corruscans* ou *P. reticulatum* nos cinco marcadores moleculares utilizados (RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$ , 18S rRNA e 16S rRNA), como “surubim híbrido F<sub>1</sub>” (“Pintachara” ou “Cachapinta”) os que apresentaram padrão de híbrido nos cinco marcadores, e como “surubim híbrido Pós-F<sub>1</sub>” quando apresentaram padrão diferente entre os marcadores (Tabela 4).

A metodologia utilizada para extração do DNA por meio de resina Chelex 5% foi eficiente. Esse fato pode ser evidenciado, pelos resultados obtidos a partir da quantificação por espectrofotometria, pois o rendimento total do DNA foi de 22,59  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Dessa forma, foi possível extrair um DNA de boa qualidade e em quantidade suficiente para a continuidade das análises moleculares.

**Tabela 3** Comparação entre a identificação fenotípica e genotípica dos indivíduos em cada local de coleta

|                          | Locais de Coleta      | Fenótipo / Genótipo |               |                  |                    | Híbridos   |            |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|---------------|------------------|--------------------|------------|------------|
|                          |                       | Pc                  | Pr            | H-F <sub>1</sub> | Pós-F <sub>1</sub> | Cachapinta | Pintachara |
| <b>Bacia do Paraguai</b> | Rio Negro (N= 17)     | 8(2)                | 9(7)          | 0(7)             | 0(1)               | 0          | 8          |
|                          | Rio Aquidauana (N= 7) | 5(2)                | 2(4)          | 0(0)             | 0(1)               | 0          | 1          |
|                          | Rio Miranda (N=7)     | 6(5)                | 1(2)          | 0(0)             | 0(0)               | 0          | 0          |
|                          | Rio Paraguai (N= 2)   | 1(1)                | 1(1)          | 0(0)             | 0(0)               | 0          | 0          |
| <b>Bacia do Paraná</b>   | Rio Ivinhema (N=49)   | 27(18)              | 11(1)         | 11(22)           | 0(8)               | 22         | 8          |
|                          | Rio Brilhante (N= 11) | 7(3)                | 4(0)          | 0(5)             | 0(3)               | 4          | 4          |
|                          | Rio Dourados (N=90)   | 69(45)              | 16(1)         | 5(34)            | 0(10)              | 38         | 6          |
| <b>TOTAL</b>             | <b>N= 183</b>         | <b>123 (76)</b>     | <b>44(16)</b> | <b>16(68)</b>    | <b>0 (23)</b>      | <b>64</b>  | <b>27</b>  |

N= número de amostras; Pc= *Pseudoplatystoma corruscans*; Pr= *Pseudoplatystoma reticulatum*; H F<sub>1</sub>= Surubim híbrido interespecífico F<sub>1</sub>; Pós-F<sub>1</sub>= Surubim híbrido interespecífico Pós-F<sub>1</sub>; Descrição do genótipo entre parênteses; “Cachapinta”= fêmea *P. reticulatum* e macho *P. corruscans*; “Pintachara”= fêmea *P. corruscans* e macho *P. reticulatum*

**Tabela 4** Exemplos de caracterização fenotípica e genotípica resultantes das análises

| Fenótipo       | Marcadores Moleculares |    |      |    |      |    |     |    |     |    | Genótipo              |
|----------------|------------------------|----|------|----|------|----|-----|----|-----|----|-----------------------|
|                | 16S                    |    | RAG2 |    | GLOB |    | EF1 |    | 18S |    |                       |
|                | Pr                     | Pc | Pr   | Pc | Pr   | Pc | Pr  | Pc | Pr  | Pc |                       |
| <b>Pintado</b> |                        | x  | x    | x  | x    | x  | x   | x  | x   | x  | “Pintachara”          |
| <b>Pintado</b> | x                      |    | x    | x  | x    | x  | x   | x  | x   | x  | “Cachapinta”          |
| <b>Pintado</b> | x                      |    | x    |    | x    |    | x   |    | x   |    | <i>P. reticulatum</i> |
| <b>Pintado</b> |                        | x  |      | x  |      | x  |     | x  |     | x  | <i>P. corruscans</i>  |
| <b>Cachara</b> |                        | x  | x    | x  | x    | x  | x   | x  | x   | x  | “Pintachara”          |
| <b>Cachara</b> | x                      |    | x    | x  | x    | x  | x   | x  | x   | x  | “Cachapinta”          |
| <b>Cachara</b> | x                      |    | x    | x  | x    | x  |     | x  |     | x  | Pós-F <sub>1</sub>    |
| <b>Cachara</b> | x                      |    | x    |    | x    |    | x   |    | x   |    | <i>P. reticulatum</i> |
| <b>Híbrido</b> |                        | x  | x    | x  | x    | x  | x   | x  | x   | x  | “Pintachara”          |
| <b>Híbrido</b> | x                      |    | x    | x  | x    | x  | x   | x  | x   | x  | “Cachapinta”          |
| <b>Híbrido</b> |                        | x  | x    |    | x    | x  |     | x  | x   |    | Pós-F <sub>1</sub>    |
| <b>Híbrido</b> | x                      |    | x    |    | x    |    | x   |    | x   |    | <i>P. reticulatum</i> |

Pc= *Pseudoplatystoma corruscans*; Pr= *Pseudoplatystoma reticulatum*

## Discussão

Toledo-Filho et al. (1994) realizando estudos de identificação genética do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos recíprocos artificiais “tambacu” e “paqui”, por meio de cinco marcadores eletroforéticos, descreveram a necessidade de se analisar, no mínimo, quatro loci nucleares. Pois conforme os híbridos F<sub>1</sub> inter cruzam com outros híbridos F<sub>1</sub>, ou retro cruzam com os parentais, as gerações seguintes (Pós-F<sub>1</sub>) vão apresentando semelhança genética com os híbridos F<sub>1</sub> e/ou com os parentais selvagens, podendo ser assim confundidos mesmo em análises genotípicas. Por isso, quanto maior o número de marcadores moleculares nucleares empregados, maior é a confiabilidade dos resultados para identificação dos híbridos Pós-F<sub>1</sub>.

Prado et al. (2012a) utilizando um marcador molecular nuclear (RAG2) e um mitocondrial (16S rRNA), conseguiram identificar as espécies puras (*Pseudoplatystoma*

*corruscans*, *Pseudoplatystoma reticulatum*) e o híbrido interespecífico F<sub>1</sub>, não distinguindo o híbrido Pós-F<sub>1</sub>.

No presente estudo realizado, o emprego de quatro marcadores moleculares nucleares (RAG2, GLOB, EF1 $\alpha$ , 18S) e um mitocondrial (16S rRNA), possibilitou diferenciar geneticamente *P. corruscans*, *P. reticulatum*, identificar os híbridos F<sub>1</sub> e os Pós-F<sub>1</sub>. Corroborando com os resultados obtidos por Hashimoto et al. (2012b).

Prado et al. (2012b), por meio de análise citogenética, observou que os híbridos F<sub>1</sub> e Pós-F<sub>1</sub> entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*, da bacia do Paraná são férteis. Isso porque *P. corruscans*, *P. reticulatum*, Híbrido F<sub>1</sub> e Pós-F<sub>1</sub> revelaram padrão citogenético com 56 cromossomos distribuídos igualmente. Essa homologia na constituição cromossômica das espécies parentais resulta, frequentemente, no emparelhamento correto dos cromossomos e segregação durante a meiose, produzindo gametas viáveis em híbridos interespecíficos. Esse fato poderia explicar a ocorrência de híbridos Pós-F<sub>1</sub> encontrados nesse trabalho no ambiente natural.

Possivelmente a maior frequência de híbridos “Cachapintas” nos rios pertencentes à Bacia Hidrográfica do Paraná, seja devido seu escape dos tanques de pisciculturas, e/ou de “pesque-pagues”. Isso deve-se ao fato do “Cachapinta” ser o híbrido mais comercializado pelas pisciculturas (Porto-Foresti et al. 2011).

A preferência de matrizes constituídas de fêmea *P. reticulatum* pelas pisciculturas deve-se ao fato do seu período reprodutivo ser maior em comparação ao da fêmea *P. corruscans* (Campos, 2010). Dessa forma, provavelmente, a maioria das pisciculturas do Estado do Mato Grosso do Sul-Brasil estejam utilizando esse tipo de matriz.

A principal fonte de dispersão de espécies cultivadas para o ambiente natural é por meio dos “pesque-pagues”, pois os escapes são praticamente inevitáveis (Fernandes et al. 2003, Porto-Foresti et al. 2008; Prado et al. 2012a; Hashimoto et al. 2012b).

A presença de híbridos “Pintachara” nos rios da Bacia Hidrográfica do Paraguai pode ser supostamente explicada, por meio da hibridação natural entre as espécies puras, que mesmo sendo rara, pode acontecer. Segundo Mallet (2005) os exemplos de hibridação na natureza são muitas vezes atribuídos à degradação ambiental, como por exemplo, um desmatamento ou qualquer outra alteração no habitat natural pode levar uma espécie a migrar para outro local onde ela não existia anteriormente, e lá cruzar naturalmente com alguma espécie filogeneticamente próxima, gerando um híbrido, que talvez não existisse se o homem não houvesse degradado o meio ambiente. Considerando que os ambientes em estudo vêm sofrendo esses impactos ambientais é possível que algo similar possa ter acontecido com as espécies migradoras de *P. corruscans* e *P. reticulatum* nos rios da Bacia Hidrográfica do Paraguai. Outro ponto importante refere-se à possibilidade de que alguns locais (pisciculturas), presentes nessa bacia, estejam realizando hibridação artificial com fêmea *P. corruscans*.

No presente estudo, a comparação entre identificação visual e genética demonstrou a eficiência da tecnologia dos marcadores moleculares para diferenciação genética entre espécies puras e híbridas, fornecendo subsídio para seleção de matrizes geneticamente puras em cruzamentos artificiais. Além disso, possibilitou a identificação de contaminação genética em ambiente natural, indicando a necessidade de gerenciamento de escapes de surubins híbridos interespecíficos das pisciculturas, estações de criações e/ou “pesque-pagues”.

Toledo-Filho et al. (1994) e Hashimoto et al. (2012b) relatam a necessidade da aplicação de técnicas moleculares aliadas a métodos visuais para confirmação das

espécies. Isso por que os híbridos apresentam características morfológicas semelhantes à de seus parentais, confundindo sua identificação visual. As técnicas moleculares (PCR multiplex e PCR-RFLP) utilizadas no presente estudo, e atualmente empregadas com a finalidade de identificar e diferenciar espécies de peixes (Prado et al. 2011; Prado et al. 2012a., Hashimoto et al. 2012b) demonstraram serem tecnologias rápidas e aplicáveis.

Embora a hibridação já tenha sido pesquisada, ainda existem inúmeras controvérsias sobre esse assunto, principalmente sobre a hibridação interespecífica. Questões como, quais as consequências da hibridação entre os parentais selvagens e os híbridos, quais as consequências do retrocruzamento no ambiente natural, qual o papel da introgressão gênica sobre a evolução dos organismos, e até que ponto a hibridação pode determinar a extinção de espécies, ainda precisam ser estudadas (Schwenk, 2008). Porém, mesmo com essas controvérsias é evidente a necessidade de implantação de projetos de fiscalização e de manejo adequado desses híbridos na piscicultura, conforme descrito também por Porto-Foresti et al. (2008), Prado et al. (2012b), Hashimoto et al. (2012a; 2012b), a fim de manter a diversidade genética entre as espécies de *P. corruscans* e *P. reticulatum*.

Sendo assim, antes de se realizar qualquer estudo de variabilidade genética, é de fundamental importância a realização prévia da identificação genética desses indivíduos, a fim de identificar os híbridos e não correr o risco de utilizá-los como puros. Essa pesquisa forneceu bases científicas para identificar a situação dos surubins híbridos interespecíficos nos rios do Estado do Mato Grosso do Sul. Além disso, gera subsídios para a realização de pesquisas sobre a variabilidade genética de *P. corruscans* e *P. reticulatum* no ambiente natural, gerenciamento para seleção de matrizes puras tanto em programas de conservação e melhoramento genético dessas espécies, quanto em estabelecimento de cruzamentos interespecíficos em pisciculturas.

## **Conclusão**

Os surubins híbridos interespecíficos F<sub>1</sub> e Pós-F<sub>1</sub> resultantes do cruzamento entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* foram identificados geneticamente em rios do Estado do Mato Grosso do Sul (Rio Negro, Rio Aquidauana, Rio Ivinhema, Rio Brilhante e Rio Dourados).

A maioria dos surubins híbridos interespecíficos dos rios da Bacia Hidrográfica do Paraná foram “Cachapinta” e na Bacia Hidrográfica do Paraguai todos foram “Pintachara”.

A identificação fenotípica, descrita pelos pescadores e/ou pesquisadores, não correspondeu, em sua maioria, com a identificação genotípica, fornecida pelos marcadores moleculares. Deste modo, confirma-se a potencialidade das ferramentas moleculares para identificação e manejo de matrizes puras para programas de conservação e melhoramento genético dessas espécies, monitoramento de híbridos em ambientes naturais e seleção de matrizes para cruzamentos em pisciculturas.

## **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” – Bauru, pelo apoio logístico, e à Colônia de Pescadores Artesanais Profissionais “Z-10” pelo auxílio na coleta do material biológico.

## Referências

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

Carvalho DC, Seerig A, Melo DC, Sousa AB, Pimenta D, Oliveira DAA (2008) Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma spp.*). Rev Bras Reprod Anim. 32(4):215-219

Fernandes R, Gomes LC, Agostinho AA (2003) Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? Acta Scientiarum: Biological Sciences 25(1):115-120. doi: 10.4025/actascibiolsci.v25i1.2089

Hashimoto DT, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012a) Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. Reviews in Aquaculture 4:108–118. doi: 10.1111/j.1753-5131.2012.01067.x

Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F (2012b) Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. Aquaculture Research 1-9. doi: 10.1111/j.1365-2109.2012.03092.x

Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20(5):229-237. doi:10.1016/j.tree.2005.02.010

Marques DKS (2002) Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. Embrapa Pantanal, Corumbá

Miranda EE (2005) Brasil em Relevô. <http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br>. Acesso em: 19 Novembro 2012

Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Alves AL, Almeida RBC, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F (2008) Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). *Genet Mol Biol* 31(1):195-202. doi: 10.1590/S1415-47572008000200005

Porto-Foresti F, Hashimoto DT, Prado FD, Senhorini JA, Foresti F (2011) A hibridação interespecífica em peixes. *Panorama da Aquicultura* 21(126):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*. *Aquaculture Research* 42:1890-1894. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02777.x

Prado FD, Hashimoto DT, Mendonça FF, 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. *Fisheries Research* 125– 126:300-305. doi:10.1016/j.fishres.2012.02.030

Prado FD, Nunes TL, Senhorini JA, Bortolozzi J, Foresti F, Porto-Foresti F (2012b) Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes). *Genet Mol Biol* 35(1):57-64. doi: 10.1590/S1415-47572012005000010

Schwenk K, Brede N, Streit B (2008) Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363(1505):2805–2811. doi: 10.1098/rstb.2008.0055

Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Bernardinho G, Calcagnotto D (1994) Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. USP, São Paulo

Yue GH, Orban L (2001) Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. *Mar Biotech* 3(3):199–204. doi: 10.1007/s10126-001-0010-9

## 5 CONCLUSÃO GERAL

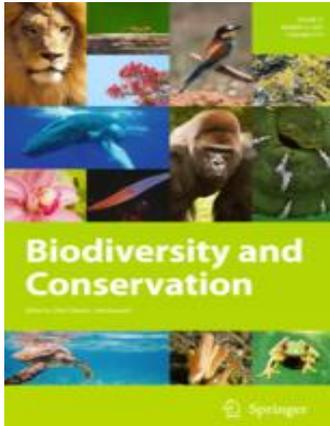
Foi possível verificar a existência de surubins híbridos interespecíficos F<sub>1</sub> e Pós-F<sub>1</sub> em rios pertencentes ao Estado do Mato Grosso do Sul, por meio das técnicas de PCR multiplex e PCR-RFLP dos genes nucleares RAG2, GLOBINA, EF1 $\alpha$  e 18S rRNA e mitocondrial 16S rRNA.

Nos rios da Bacia Hidrográfica do Paraná a maioria dos surubins híbridos identificados foram “Cachapinta”, indicando a possibilidade de escapes dos tanques de pisciculturas, estações de criação e/ou “pesque-pagues”, visto que a matriz utilizada para realização do cruzamento interespecífico artificial é preferencialmente de fêmea *P. reticulatum*. Já nos rios da Bacia Hidrográfica do Paraguai os surubins híbridos interespecíficos foram identificados como “Pintachara”, levantando o pressuposto da ocorrência de hibridação natural entre as espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* nessa bacia, ou hibridação artificial onde os produtores próximos aos rios dessa bacia utilizaram matriz de fêmea *P. corruscans* para o cruzamento interespecífico.

Verificou-se que somente a identificação visual baseada em caracteres fenotípicos para espécies puras e seus híbridos, não é um método confiável, sendo necessário então o emprego de tecnologias moleculares.

O presente estudo, por meio da utilização dessas técnicas moleculares, fornece subsídio para análise de variabilidade genética de *P. corruscans* e *P. reticulatum* em ambientes naturais, projetos de conservação e melhoramento genético dos parentais puros, estabelecimento de programas de fiscalização e manejo adequado destes híbridos em pisciculturas, assim como o monitoramento no ambiente natural.

## ANEXO I



### *Biodiversity and Conservation*

Editor-in-Chief: David L. Hawksworth

ISSN: 0960-3115 (print version)

ISSN: 1572-9710 (electronic version)

2011 Impact Factor: 2.238

### **Aims and Scope**

Biodiversity and Conservation is an international journal devoted to the publication of articles on all aspects of biological diversity - its description, analysis and conservation, and its controlled rational use by humankind. The scope of Biodiversity and Conservation is wide and multidisciplinary, and embraces all life-forms. Research papers, as well as Editorials, Comments and Research Notes, on biodiversity and conservation, and contributions which deal with the practicalities of conservation management, economic, social and political issues and with case studies are welcome. The journal provides a forum for examining the conflict between sustainable development and human dependence on biodiversity, in such fields as agriculture, environmental management and biotechnology. The Editors encourage contributors from developing countries in order to realize proper global perspectives on matters of biodiversity and conservation.

### **Instructions for Authors**

#### **GENERAL**

##### **Language**

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Authors are responsible for ensuring the language quality prior to submission. Is there an existing module for this? It should probably be made clear on submission to all journals.

Spacing: Please double-space all material, including notes and references.

##### **Nomenclature**

The correct names of organisms conforming with the international rules of nomenclature must be used. Descriptions of new taxa should not be submitted unless a specimen has been deposited in a recognized collection and it is designated as a type strain in the paper. Biodiversity and Conservation uses the same conventions for the genetics nomenclature of bacteria, viruses, transposable elements, plasmids and restriction enzymes as the American Society for Microbiology journals.

### **Article types**

The journal publishes original research, and also Editorials, Comments and Research notes. These types of articles should be submitted to the Journals Editorial Office in the usual way, but authors should select whether they are Original Research, Editorials, Comments or Research notes.

## **MANUSCRIPT SUBMISSION**

### **Manuscript Submission**

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### **Permissions**

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### **Online Submission**

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## **TITLE PAGE**

### **Title Page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

### **Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## **TEXT**

### **Text Formatting**

- Manuscripts should be submitted in Word.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

## **Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

## **Abbreviations**

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## **Footnotes**

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

## **Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

## **REFERENCES**

### **Citation**

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
  - This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

### **Reference list**

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

*Journal article*

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

*Article by DOI*

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

*Book*

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

*Book chapter*

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

*Online document*

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

*Dissertation*

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

**TABLES**

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
  - Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
  - Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

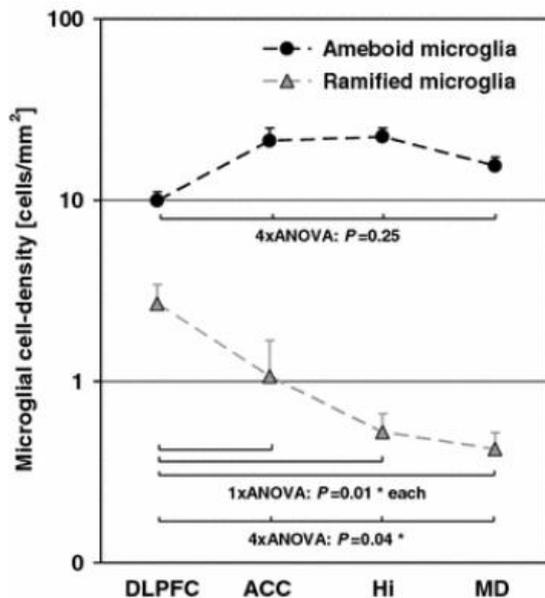
## ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

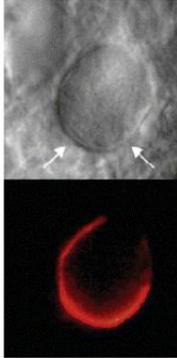
### Line Art



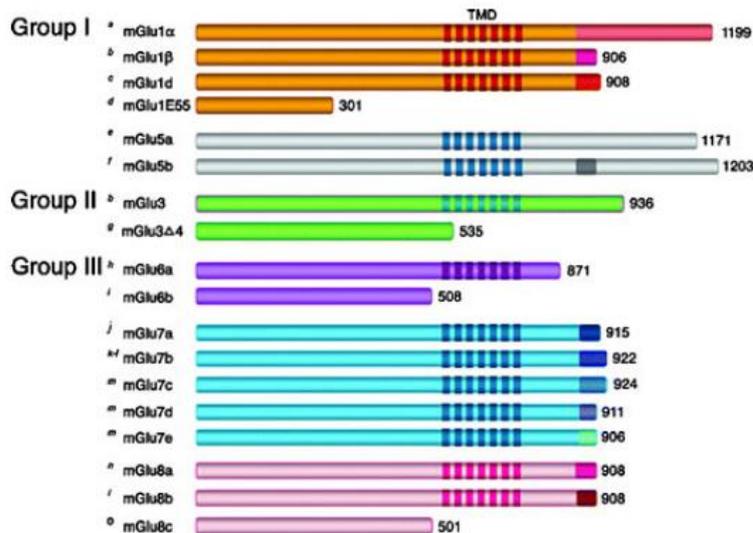
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

## Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



## Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi
- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### **Figure Lettering**

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
  - Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### **Figure Numbering**

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text.
  - Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### **Figure Captions**

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
  - No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
  - Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
  - Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### **Figure Placement and Size**

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### **Permissions**

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

## Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

## DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process. The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

### For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。理文编辑

### For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、社をご紹介しています。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンググループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。エダンググループ ジャパン

### For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

## ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

## Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### **Audio, Video, and Animations**

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

### **Text and Presentations**

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### **Spreadsheets**

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

### **Specialized Formats**

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### **Collecting Multiple Files**

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### **Numbering**

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”.

### **Captions**

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### **Processing of supplementary files**

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### **Accessibility**

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).