

Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.)

Molecular Identification of Fishes: the case of Surubim (Pseudoplatystoma spp.)

Daniel Cardoso de *Carvalho*^{1,3}, Arno *Seerig*¹, Daniela *Chemim de Melo*¹, Alexandre *Benvindo de Sousa*², Danilo *Pimenta*¹, Denise A.A. *Oliveira*¹

¹Laboratório de Genética, Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Colégio Técnico da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

³Correspondência: carvalhodcc@yahoo.com.br

Resumo

Híbridos de surubim vêm sendo cultivados em pisciculturas no lugar das espécies puras. Resultados genéticos obtidos revelaram que os híbridos de surubim comercializados no Brasil são do tipo Cachapinta (fêmea de cachara e macho de pintado). Ferramentas genéticas para a caracterização de espécies híbridas têm sido o objeto de diversos estudos e podem ser úteis no monitoramento e manejo de hibridações. A identificação genética do surubim e de seus híbridos é de grande importância para a conservação dos estoques naturais, podendo ser aplicada na detecção de fraudes na venda de supostos estoques de surubim “puros” e, assim, evitar a utilização de híbridos na formação de estoques genéticos puros para repovoamento e produção comercial.

Palavras-chave: identificação molecular genética, surubim ou pintado, cachara, híbrido, Barcode, *Pseudoplatystoma*

Abstract

Hybrids of the catfish surubim have been grown in several aquaculture farms instead of the pure species. Genetic results revealed that the commercially important catfish hybrid extensively used in Brazil is of the type “Cachapinta” (female of cachara and male of pintado). Genetic tools for the characterization of hybrid have been the objective of several studies, and when possible it can be useful in the monitoring of hybridizations. The genetic identification of the surubim and its hybrids are of great importance for the conservation of natural stocks and could be applied in the detection of frauds, commercialization of hybrids instead of pure species and to avoid the use of hybrids into the restocking process.

Keywords: *molecular identification, catfish, surubim, cachara, hybrids, Barcode, Pseudoplatystoma*

Identificação molecular de espécies de peixes

Um grande problema enfrentado por produtores é a concorrência pela comercialização de outros tipos de peixes considerados menos nobres para a produção de filés e produtos processados, erroneamente vendidos como surubins. Segundo Smith *et al.* (2008), a certificação de filés de peixes necessita usualmente da aplicação de ferramentas moleculares, uma vez que a maioria das características morfológicas utilizadas na identificação das espécies são removidas durante o processo de filetagem. Segundo os mesmos autores, os primeiros métodos de identificação baseados em eletroforese de proteínas foram reconhecidos como métodos oficiais para identificação de filés de peixes. No entanto, as proteínas são estáveis em produtos frescos e congelados, mas são desnaturadas e danificadas por calor ou processo de salga, o que torna tal metodologia inadequada para identificação de produtos de peixes defumados e enlatados.

Marcadores moleculares podem ser utilizados em estudos de populações de peixes e em aquicultura com diversos objetivos, como, por exemplo, para identificação de híbridos e espécies, estabelecimento de relações filogenéticas, estimativa do tamanho efetivo de populações, identificação de populações-chave para conservação de recursos genéticos, determinação genética do impacto da introdução de populações e peixes cultivados em uma determinada área. Informações moleculares podem ser úteis, ainda, na definição de estratégias de melhoramento e construção de mapas genéticos (Ferguson *et al.*, 1995) e para a certificação de produtos processados (Smith *et al.*, 2008).

Utiliza-se em estudos de biodiversidade molecular a mesma matéria bruta envolvida na evolução das espécies: a variabilidade genética. Essa variedade permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (Solé-Cava, 2001). Qualquer material biológico contendo DNA pode ser usado em testes moleculares, sendo apropriados, por exemplo, pele, nadadeiras, músculos, vísceras e sangue.

Barcode genético

O sistema de identificação molecular por *Barcode* genético foi proposto por Hebert *et al.* (2003) e consiste na aplicação de uma pequena sequência de DNA mitocondrial (gene COI) para a discriminação de todas as espécies vivas do planeta como um sistema “bioidentificador” universal.

Existe grande suporte empírico para o conceito do *Barcode* em trabalhos com invertebrados (Hebert *et al.*, 2004), pássaros (Hogg e Hebert 2004), peixes (Ward *et al.*, 2005), entre outros. Entretanto, ainda há controvérsias na efetividade desse sistema de identificação genética (e.g., Lipscomb *et al.*, 2003, Moritz e Cícero 2004). Para o efetivo funcionamento do *Barcode*, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie precisam apresentar maior similaridade do que entre espécies. Estudos recentes demonstram que esta é a situação mais comum, mas que existem exceções (Hurst e Jiggins, 2005). Outro problema é a hibridização entre espécies, pois, uma vez que o mtDNA é de herança materna, qualquer híbrido ou subsequente geração teria identificado apenas o DNA materno, o que pode gerar dúvidas taxonômicas.

A identificação inequívoca dos peixes, isto é, ovos, alevinos, adultos e seus produtos, é importante para diversas áreas e pode viabilizar, por exemplo, a detecção de fraude ou substituição de espécies em transações comerciais (Smith *et al.*, 2008), assistência na sustentabilidade e no manejo da pesca a longo prazo (Metcalf *et al.*, 2007) e ainda incremento da pesquisa em conservação na identificação de espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004).

Até o momento, uma grande variedade de métodos vem sendo utilizada para a identificação de espécies de peixes (Ward e Grewe 1994, Smith *et al.*, 2008). O *Barcode*, técnica universal de identificação genética de espécies, é uma delas e tem sido aplicada em todo o mundo, com pelo menos 4824 espécies analisadas (Fish-Bol - <http://www.fishbol.org/> acessado em maio de 2008). Recentemente, o órgão norte-americano FDA (*Food and Drugs Administration*) implementou o *Barcode* genético na identificação de peixes e seus produtos para certificação e detecção de fraudes (Yancy *et al.*, 2008).

O surubim e seu híbrido

No Brasil, os surubins ou pintados (*Pseudoplatystoma* spp.) são peixes de água doce de alto valor comercial, considerados produtos nobres por apresentarem carne saborosa, com baixo teor de gordura e ausência de espinhas intramusculares. Possuem, assim, grande importância econômica e social em suas regiões de ocorrência (Crepaldi, 2008).

Na bacia do rio São Francisco, encontra-se apenas a espécie *Pseudoplatystoma corruscans*, conhecida popularmente como surubim ou pintado. É a espécie de maior porte do gênero, podendo alcançar até 120 kg (Sato *et al.*, 2003), e um dos principais recursos pesqueiros dessa bacia (Menezes 1956, Godinho *et al.*, 1997, Godinho e Godinho 2003). Na bacia platina, o surubim (*P. corruscans*) e o cachara (*P. reticulatum*) são encontrados em sympatria. Já na bacia amazônica, ocorrem as espécies cachara (*P. reticulatum*) e caparari (*P. tigrinum*); (Welcomme, 1985; Petrere, 1995; Buitrago-Suarez, 2007).

Iniciativas com o objetivo da domesticação e conservação do *Pseudoplatystoma corruscans* começaram a produzir resultados satisfatórios (Miranda e Ribeiro, 1997) a partir da década de 1990. Hoje, é possível encontrar pesqueiros que comercializam surubins produzidos em cativeiro, bem como estações de piscicultura de órgãos governamentais produtoras e distribuidoras de alevinos desta espécie, tanto para produção como para repovoamento de rios (Sato *et al.*, 2003).

O cachapinta (cruzamento de fêmea de cachara com macho de pintado) e o pintachara (cruzamento de fêmea de pintado com macho de cachara; Tab. 1) são importantes híbridos que vêm sendo cultivados em pisciculturas no lugar das espécies puras. Segundo os produtores de alevinos, isto se deve ao fato de esses serem mais dóceis, aprenderem a se alimentar mais facilmente e possivelmente apresentarem taxa de crescimento mais elevada (Crepaldi *et al.*, 2004). Os híbridos têm sido cultivados em todo o Brasil e já vêm sendo encontrados na natureza (como no rio Paraná), provavelmente devido a escapes de pisciculturas (Alberto Prioli, dados não publicados). Existem preocupações sobre seu impacto nas espécies naturais, havendo a possibilidade de contaminação genética por introgressão. Entretanto, nenhum estudo nesse sentido foi conduzido ou publicado até a presente data.

Tabela 1. Hibridações frequentes realizadas em pisciculturas no Brasil.

Nome comum do híbrido	Fêmea	Macho
Tambatinga	Tambaqui - <i>Colossoma macropomum</i>	Pirapitinga - <i>Piaractus brachypomus</i>
Piaupara	Piauçu - <i>Leporinus macrocephalus</i>	Piapara - <i>Leporinus enlongatus</i>
Cachapira	Cachara - <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	Pirarara - <i>Phractocephalus hemiliopterus</i>
Cachapinta	Cachara - <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	Pintado ou Surubim- <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>
Pintachara	Pintado ou Surubim- <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Cachara - <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>
Paqui	Pacu - <i>Piaractus mesopotamicus</i>	Tambaqui - <i>Colossoma macropomum</i>
Tambacu	Tambaqui - <i>Colossoma macropomum</i>	Pacu - <i>Piaractus mesopotamicus</i>

Segundo Vieira e Pompeu (2001), nos Estados Unidos a hibridização entre espécies está entre as cinco principais causas de perda de biodiversidade. No Brasil, ainda não existem estudos para avaliar os efeitos da hibridização, seja do ponto de vista ecológico ou produtivo (Alves *et al.*, 2007).

Alguns híbridos têm demonstrado, entretanto, boa *performance* nos sistemas produtivos, especialmente em regiões tropicais e, assim, são utilizados na produção comercial. Crepaldi *et al.* (2004) compararam a linhagem híbrida de cruzamentos entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* com a linhagem pura de *P. corruscans* do rio São Francisco em um ensaio de 84 dias com três densidades de estocagem. Para a classe de peso avaliada, os híbridos apresentavam melhor desempenho em relação aos espécimes puros, independentemente das densidades de estocagem. Por esse motivo, o híbrido vem sendo preferido pelos produtores, substituindo as espécies puras.

Alguns pesquisadores, porém, relatam que híbridos de *P. corruscans* com sua congênera *P. reticulatum* (cachara) estão sendo vendidos a produtores como “surubins puros”. Também há relatos de híbridos sendo encontrados na natureza (Alves *et al.*, 2007). Os aspectos biológicos e zootécnicos (reprodução, crescimento, caracterização genética, nutrição, entre outros) desse híbrido e seu impacto na fauna nativa e nos grupos cultivados ainda são desconhecidos.

O uso de ferramentas genéticas para a caracterização de espécies híbridas tem sido o objeto de diversos estudos (Hanfling *et al.*, 2005, Teixeira e Oliveira, 2005). Tais ferramentas podem ser muito úteis no monitoramento e manejo de hibridações.

Híbridos de surubim foram analisados na Escola de Veterinária da UFMG utilizando-se o gene mitocondrial COI como marcador molecular. O híbrido cultivado nessa piscicultura é conhecido popularmente como “ponto e vírgula” (Fig. 1a) devido ao seu padrão de pigmentação. Esses peixes foram identificados como sendo do tipo “cachapinta” (fêmea de cachara e macho de pintado), já que o mtDNA (herdado maternamente) foi idêntico ao do cachara.

A análise do mtDNA de outro lote de alevinos adquiridos como “surubins puros” (Fig. 1b) também os identificou como provenientes de *P. reticulatum* (cachara) e não de surubim (*P. corruscans*), indicando que esses animais não poderiam ser “surubins puros”. Apesar de seu padrão pintado, distinto do padrão de pigmentação observado entre os híbridos comuns entre surubim e cachara, o suposto “surubim puro” foi posteriormente determinado como sendo o cruzamento do peixe jundiá com o cachara.

Apesar das limitações da utilização de um marcador de herança materna como o mtDNA no estudo de hibridações, sua aplicação na identificação de híbridos de surubim pode ser utilizada como indicador de pureza. Análises com marcadores moleculares nucleares específicos para o surubim, como os microsatélites, já estão disponíveis, mas ainda apresentam limitações técnicas na identificação desses híbridos. Dessa forma, a identificação por *Barcode* utilizando-se um gene mitocondrial se mostrou útil na identificação do híbrido cachapinta, que apresenta o DNA mitocondrial de cachara, indicando a origem materna do híbrido.

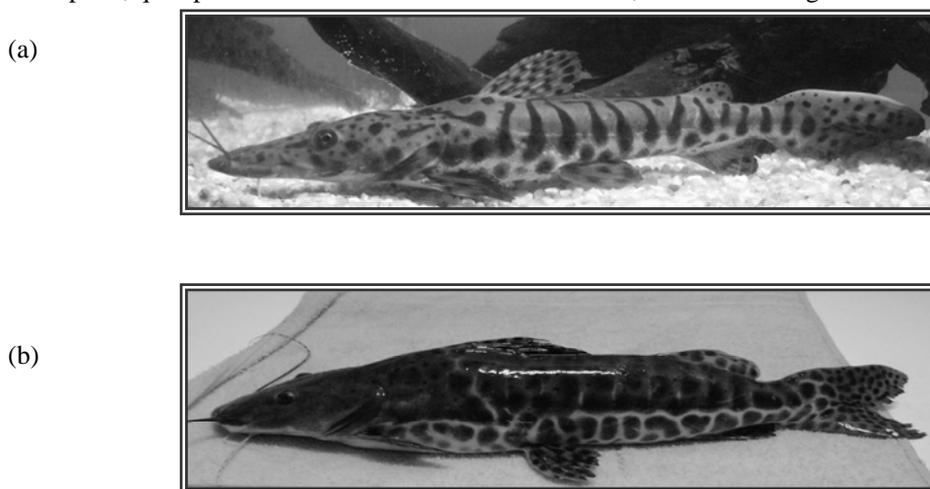


Figura 1. Dois híbridos estudados nos estoques de peixes do LAQUA - Escola de Veterinária da UFMG. (a) híbrido do tipo “ponto e vírgula”, (b) suposto “surubim puro”.

Conclusões

A identificação genética de peixes e seus produtos é uma ferramenta importante na detecção de fraudes, identificação de modos de cruzamentos interespecíficos e identificação de híbridos de surubim.

O híbrido cachapinta (fêmea de cachara e macho de pintado) e outros tipos (e.g. cruzamento de cachara com jundiá), foram detectados em estoques da Escola de Veterinária, adquiridos como “surubins puros” por meio da comercialização com produtores de peixes. Como demonstrado neste estudo de caso, a detecção de supostas espécies de surubim “puros” é uma ferramenta genética de grande aplicação na aquacultura no Brasil.



Agradecimentos

Os autores são gratos à equipe do Laboratório de Aquicultura da UFMG (LAQUA), pela coleta dos animais, à FAPEMIG (Projeto CBB 243-04), pelo auxílio financeiro. Ao CNPq, pela Bolsa de pós-doutorado concedida a D.C. Carvalho.

Referências

- Alves C, Vieira F, Magalhaes A, Brito M.** Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: Bert TM (Ed.). *Ecological and genetic implications of aquaculture activities, reviews: Methods and technologies in fish biology and fisheries*. Dordrecht: Springer, 2007. p.291-314.
- Buitrago-Suarez, UA.** Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, v.1512, p. 1-38, 2007
- Crepaldi DV.** *Ultra-sonografia em surubins (Pseudoplatystoma corruscans): avaliação de parâmetros reprodutivos e características de carcaça*. 2008. 59f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2008.
- Crepaldi DV, Miranda MOT, Ribeiro LP, Teixeira EA, Melo DC, Sousa AB.** Comparação do desempenho de surubim puro, *P. corruscans* e o híbrido *P. corruscans* x *P. fasciatum* em 3 densidades de estocagem. In: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41, 2004, Campo Grande. Anais ... Campo Grande: SBZ, 2004.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodhöl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity, P, Hynes RA. R.A.** The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *J Fish Biol*, v.47, suppl A, p.103-126, 1995.
- Godinho AL, Godinho HP.** Brief vision on the São Francisco. In: Godinho HP, Godinho AL (Ed.). *Waters, fishes, and fishermen of the São Francisco of Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.15-24
- Godinho HP, Godinho AL, Miranda MTO, Santos JE.** Fisheries and biology of the surubim *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco River at Pirapora, MG, Brazil. In: Miranda MTO. *Surubim*. Brasília: IBAMA, 1997. p.27-42,
- Hanfling B, Bolton P, Harley M, Carvalho GR.** A molecular approach to detect hybridization between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). *Freshwater Biol*, v.50, p.403-417, 2005.
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W.** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.101, p.14812-14817, 2004.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B*, v.270, p.313-322, 2003.
- Hogg ID, Hebert PDN.** Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool*, v.82, p.749-754, 2004.
- Hurst GD, Jiggins FM.** Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc Biol Sci*, v.272, p.1525-1534, 2005.
- Lipscomb D, Platnick N, Wheeler Q.** The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, v.18, p.65-66, 2003.
- Menezes RS.** Fishery and fish culture in the Sao Francisco Valley. *Bol Sec Agric Ind Com Est Pernambuco*, v.23, p.43-105, 1956.
- Metcalf JL, Pritchard VL, Silvestri SM, Jenkins JB, Wood JS, Cowley DE, Evans RP, Shiozawa DK, Martin AP.** Across the great divide: genetic forensics reveals misidentification of endangered cutthroat trout populations. *Mol Ecol*, v.16, p.4445-4454, 2007.
- Miranda MOT, Ribeiro LP.** Rendimentos de processamento do Surubim *Pseudoplatystoma corruscans* In: Miranda MOT. (org) *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p.101-112 (Coleção Meio Ambiente, Séries de Estudos de Pesca, 19).
- Moritz C, Cicero C.** DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol*, v.2, p.354, 2004.
- Petrere Jr, M.** A pesca de água doce no Brasil. *Ciênc Hoje*, v.19, p.28-33, 1995.
- Sato Y, Godinho HP.** Migratory fishes of the São Francisco River. In: Carolsfeld J, Harvey B, Baer, A (Ed.). *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. Ottawa, International Development Research Centre/World Bank, 2003. p.197-228.
- Smith PJ, McVeagh SM, Steinke D.** DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *J Fish Biol*, v.72, p.464-471, 2008.
- Solé-Cava AM.** Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Mاتيoli, S.R (Ed.). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.171-192
- Teixeira AS, Oliveira SS.** Evidence for a natural hybrid of peacock bass (*Cichla monoculus* vs. *Cichla temensis*) based on esterase electrophoretic patterns. *Genet Mol Res*, v.4, p.74-83, 2005.



- Vieira F, Pompeu P.** Peixamentos, uma alternativa eficiente? *Ciênc Hoje*, v.175, p.29-33, 2001.
- Ward RD, Zemlak, TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD.** DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.360, p.1847-1857, 2005.
- Ward RD, Grewe PM.** Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Rev Fish Biol Fish*, v.4, p.300-325, 1994.
- Welcomme RL.** *River fisheries*. Rome: FAO, 1985. 330p. (FAO Fisheries Technical Paper, 262).
- Yancy HF, Zemlak TS, Mason JA, Washington JD, Tenge BJ, Nguyen NLT, Barnett JD, Savary WE, Hill WE, Moore MM, Fry FS, Randolph SC, Rogers PL, Hebert PD.** Potential use of DNA barcodes in regulatory science: applications of the regulatory fish encyclopedia. *J Food Prot*, v.71, p.210-217, 2008.
-