

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Steindachnerina* (PISCES, CHARACIFORMES) DA PLANÍCIE ALAGÁVEL DO ALTO RIO PARANÁ

Paula Garcia Martin*

Alessandra Valéria de Oliveira**

Alberto José Prioli***

Sônia Maria Alves Pinto Prioli****

RESUMO: *Steindachnerina insculpta* era a única espécie do gênero no terço inferior do alto Rio Paraná. Com a submersão dos saltos de Sete Quedas, um segmento do médio Paraná passou a ter continuidade com o alto Rio Paraná e populações de *Steindachnerina brevipinna* foram introduzidas na região. Essas espécies próximas poderiam estar formando híbridos naturais e iniciando um processo de homogeneização genética na região. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologia para caracterização molecular de *S. insculpta* e *S. brevipinna* e identificação de possíveis híbridos através da metodologia SPAR. Foram obtidos marcadores moleculares diagnósticos para as duas espécies e dos 50 indivíduos analisados, somente um apresentou a presença de ambos os marcadores das espécies parentais, indicando ser um híbrido natural. Em função do baixo número de indivíduos híbridos encontrados, provavelmente estes são estéreis e não estão retrocruzando com as espécies parentais. Dessa forma, não existe risco a longo prazo de introgressão de genes no pool gênico de ambas as espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Rio Paraná; *Steindachnerina*; SPAR.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Steindachnerina* (PISCES, CHARACIFORMES) POPULATIONS FROM UPPER PARANÁ RIVER FLOODPLAIN AREAS

ABSTRACT: *Steindachnerina insculpta* was the only species of the gender in the inferior third of the upper Paraná River. With the submersion of Sete Quedas waterfalls, a segment of the middle section of the Paraná River became the continuity of the upper Paraná River and populations of *Steindachnerina brevipinna* were introduced in the area. Those close species could be forming natural hybrids and starting a process of genetic homogenization in the area. The main goal of this research was to establish methodology for the molecular characterization of *S. insculpta* and *S. brevipinna* and to identify possible hybrids through the SPAR methodology. Diagnostic molecular markers were obtained for the two species and only one among the 50 analyzed individuals presented markers of both parental species, indicating to be a natural hybrid. Due to the low number of hybrid individuals found, we may infer that they are probably sterile and they are not backcrossing with parental species. Therefore, there are no long term risks of introgression of genes in the genetic pool of both species.

KEYWORDS: Paraná River; *Steindachnerina*; SPAR.

* Bióloga graduada no Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. E-mail: paulagarcia_22@hotmail.com

** Docente do curso de Ciências Biológicas - Departamento de Ciências Biológicas no Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. E-mail: alessoli@cesumar.br

*** Docente do curso de Ciências Biológicas - Departamento de Biologia Celular e Genética na Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: ajprioli@nupelia.uem.br

**** Docente do curso de Agronomia - Departamento de Biologia Celular e Genética na Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: priolis@nupelia.uem.br

INTRODUÇÃO

A transferência de espécies de peixes e seus componentes genéticos, por ação antrópica, para regiões fora de suas áreas nativas, embora antiga acentuou-se a partir do final do século retrasado, intensificando-se entre 1950 e 1985. Neste período ocorreram aproximadamente 45% das introduções até então registradas em diferentes países (AGOSTINHO; JULIO JR., 1996). Nas últimas décadas, apesar de todas as recomendações, tais procedimentos, lado a lado com o impacto de maiores densidades humanas, industrialização, alteração e interferência nos habitats de água doce e outras atividades antropogênicas, vêm colocando em risco a estabilidade dos ambientes naturais em todo o mundo.

As bacias hidrográficas da região neotropical estão entre as regiões de maior diversidade de peixes do planeta, mas essa biodiversidade se encontra ameaçada através das tantas formas de degradação de habitats. Essas regiões foram as que mais receberam espécies exóticas (25,3% do total mundial) (WELCOMME, 1988), sendo o Brasil o país com o maior número de introduções (AGOSTINHO; JÚLIO JR., 1996). Introdução de espécies exóticas em ambientes aquáticos geralmente resulta em um problema insolúvel, principalmente onde a fauna nativa é escassa, uma vez que seu controle ou remoção após a introdução se torna praticamente impossível.

Embora os efeitos ecológicos da introdução de espécies já estejam bem compreendidos, especialmente efeitos relacionados à competição, predação e parasitismo, os efeitos genéticos e os impactos da hibridização entre espécies relacionadas, também representando um mecanismo de extinção de espécies e ameaça à integridade de pools gênicos endêmicos, são muito menos estudados. Além dos efeitos genéticos diretos da introdução de espécies exóticas, que incluem híbridos estéreis (causando efeitos genéticos mínimos na população) e híbridos viáveis, que podem cruzar entre si ou retrocruzar com espécies parentais culminando com a introdução de genes das espécies introduzidas no pool gênico das espécies nativas, podemos observar efeitos genéticos indiretos da introdução de espécies exóticas. Um tipo de efeito genético indireto é a alteração de forças seletivas, pois a introdução de formas não nativas traz novas formas de competição, predação, modificações ambientais, além de parasitas e doenças que podem contribuir para a modificação das pressões de seleção. Uma vez que as pressões seletivas são modificadas, o pool gênico das espécies nativas deve evoluir para que as populações ou espécies sobrevivam. A perda da integridade genética através da hibridização entre espécies introduzidas e nativas tem sido relatada por diversos

autores (MORIZOT et al., 1991; PIERCE & VAN DEN AVYLE, 1997; SCRIBNER; PAGE; BARTRON, 2001; PERRY; LODGE; FEDER, 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

Scribner, Page e Bartron (2001) identificaram quatro fatores contribuintes como prováveis causas da hibridização em peixes: perda de habitat (perda ou alteração de habitat de desova); expansão de área, através da remoção de barreiras de isolamento (por atividades humanas ou processos naturais); aquicultura e introdução. Mecanismos de isolamento espacial são mais frequentemente interrompidos por atividades humanas, como construção de reservatórios e canais e mudanças de cursos d'água para atividades de agricultura. Nesse caso, espécies alopátricas passam a conviver em simpatria e dessa maneira o mecanismo de isolamento pode ser rompido. Esse problema pode ser maximizado se o habitat de desova é limitado, se as espécies selecionam locais similares de desova ou se a abundância entre elas difere substancialmente.

Os saltos de Sete Quedas constituíam uma barreira geográfica que delimitava os segmentos alto e médio do Rio Paraná, e representava uma barreira natural à dispersão de peixes (AGOSTINHO; ZALEWSKI, 1996). Com a construção da Hidrelétrica de Itaipu essa barreira foi deslocada para 150 km abaixo e mais de 30 espécies do médio e baixo Paraná invadiram o trecho superior (AGOSTINHO et al., 1997), espécies estas que poderiam estar, até então, parcialmente isoladas. *Steindachnerina brevipinna* foi uma dessas espécies introduzidas e estaria colonizando o alto Rio Paraná. Anteriormente ao fechamento da barragem de Itaipu não havia registro de ocorrência da espécie *S. brevipinna* no alto Rio Paraná, isto é, acima dos Saltos de Sete Quedas. Recentemente, muitos exemplares de *S. brevipinna* têm sido coletados em campanhas do Nupélia na planície de inundação do alto Rio Paraná (informação verbal)¹.

A espécie *S. insculpta* é endêmica do rio Paraná superior. A presença e a ausência de mácula na nadadeira dorsal caracterizam as espécies *S. brevipinna* e *S. insculpta* (Figura 1A; 1B), respectivamente.



Figura 1A Exemplar de *Steindachnerina brevipinna*

¹ Informação fornecida por C. S. Pavanelli.

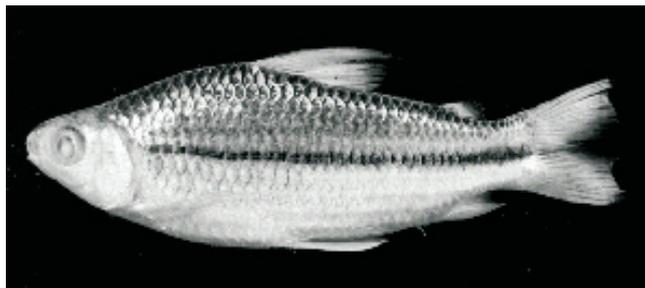


Figura 1B Exemplar de *Steindachnerina insculpta*

Entre os indivíduos de *S. brevipinna* coletados, alguns apresentavam a mácula da nadadeira dorsal pouco evidente, o que poderia indicar a ocorrência de híbridos naturais entre *S. brevipinna* e *S. insculpta*. Oliveira e colaboradores (2002), utilizando marcadores moleculares RAPD, demonstraram que alguns marcadores são exclusivos de *S. brevipinna* e outros, de *S. insculpta*. Este trabalho esclareceu, ainda, que os indivíduos com mácula intermediária pertencem, de fato, à espécie *S. brevipinna* e não são híbridos. No entanto, foi encontrado um indivíduo sem mácula com características moleculares e morfológicas das duas espécies. Em outras palavras, o perfil eletroforético deste indivíduo apresenta bandas das duas espécies, evidenciando tratar-se de um híbrido natural entre as duas espécies.

A introdução de uma nova espécie na planície de inundação do alto Rio Paraná com proximidade genética com uma espécie nativa suficiente para a ocorrência de híbridos naturais pode ter consequências importantes de naturezas diversas. De imediato, a nova espécie pode estar competindo por espaço, alimento e locais de desova. Consequentemente, uma das espécies poderia estar interferindo no ciclo de vida da outra e predominando por alguma vantagem adaptativa. A longo prazo, isso pode acarretar alterações irreversíveis e importantes na comunidade biótica local, já que as interações entre as espécies podem provocar extinções. Uma alteração da comunidade local, de natureza diversa, poderia resultar de hibridizações naturais. Se os híbridos forem férteis, existe a possibilidade de extinção por homogeneização genética entre a população nativa e a população invasora. Portanto, a avaliação e monitoramento das populações das duas espécies na planície de inundação produzirão informações sobre a dinâmica das interações entre espécies próximas recentemente colocadas em contato. O desenvolvimento deste projeto disponibiliza nova ferramenta molecular para aquisição de conhecimento sobre estas interações interespecíficas.

O uso de metodologias moleculares pode gerar informa-

ções preciosas para predizer a probabilidade de hibridização e introgressão entre espécies nativas e exóticas. A discriminação desses indivíduos, populações ou espécies e o seu monitoramento são de extrema importância para o manejo.

Uma das técnicas utilizadas é conhecida como *Single Primers Amplifications Reactions* (SPAR), que tem gerado marcadores moleculares efetivos em plantas e animais (GUPTA et al., 1994). A amplificação é realizada via PCR e a peculiaridade da técnica é o emprego de um único *primer* com a sequência repetitiva de um microssatélite ou SSR (*single sequence repeats*). Os *primers* SPAR com sequências tetranucleotídicas mostram ser eficientes na produção de padrões polimórficos informativos intraespecíficos e interespecíficos (GUPTA et al., 1994; FERNANDES-MATIOLI, 1999; LUCIO, 2002; ALMEIDA, 2005), uma vez que amplificam regiões entre dois blocos de microssatélite.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a diferenciação genética entre populações de *Steindachnerina insculpta* e *Steindachnerina brevipinna* da Planície de Inundação do alto Rio Paraná, através da obtenção de marcadores moleculares espécie-específicos e identificar a presença desses marcadores moleculares SPAR em possíveis híbridos naturais, visando a obtenção de dados que corroborem a quebra de mecanismos de isolamento entre essas populações.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Coleta e Preservação das Amostras

Foram coletados 50 espécimes de *Steindachnerina*, sendo 16 indivíduos com mácula e 34 sem mácula em vários pontos da Planície de Inundação do alto Rio Paraná, incluindo lagoas, rios, canais, Rio Baía e Rio Paraná. Os peixes foram fixados em álcool etílico comercial e estocados em freezer -20°C.

2.1.2 Extração de DNA

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Amostras de tecido muscular de $\pm 0,5$ cm² foram retiradas de cada peixe, maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 500 μ l de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e Sacarose 5%), 500 μ l de tampão TH

(Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, Sacarose 5%, Espermina 0,15 mM e Espermidina 0,15 mM) pH 8,0 e 5 µl de proteinase K (20 µg/µl) por 2 horas em banho-maria a 37°C. Em seguida, o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado. O pellet obtido foi ressuspenso em 50 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) com RNase. A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 1% por meio de comparação com DNA de fago λ de concentração conhecida.

2.1.3 Amplificação via SPAR

Para a aplicação da técnica SPAR foram realizados testes com dez *primers* com sequências de microssatélites. Dos *primers* testados, três deram bons resultados e foram selecionados para serem utilizados na amplificação do DNA de todos os indivíduos coletados, sendo eles: (GGAC)₃A, (GGAC)₃C e (AAGC)₄. Estes *primers* produziram bandas nítidas e reproduzíveis, fornecendo marcadores polimórficos para cada espécie.

Cada um dos indivíduos analisados teve seu DNA submetido à amplificação em um termociclador. Foram utilizados, além do DNA e de um único *primer*, reagentes como: tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2mM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reacção de Taq-polimerase e água suficiente para completar 13 µl.

A metodologia SPAR-PCR (Single *Primers* Amplifications Reactions) consiste na amplificação do DNA do organismo, que é submetido a uma sequência de nove etapas incluídas em 33 ciclos sucessivos. Em cada ciclo, inicialmente o DNA é desnaturado à temperatura de 94 °C, em seguida a temperatura é baixada para 45° C, onde se permite o anelamento do *primer* em regiões homólogas encontradas no genoma. A elevação da temperatura para 72 °C permite a atuação da Taq-polimerase e a síntese de polinucleotídeo complementar a uma das fitas da região intermediária entre dois sítios de anelamento do *primer* localizados em fitas opostas. Após a etapa de polimerização, o ciclo seguinte é iniciado e novamente os componentes são misturados. A amplificação ocorre em ordem exponencial e dura cerca de 3 horas.

Para a separação dos produtos amplificados foi utilizado gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídio. A visualização dos fragmentos foi feita em um transluminador sob luz UV. A análise foi realizada pelo registro dos comprimentos, em pb, das bandas produzidas.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisados 50 espécimes do gênero *Steindachnerina*, de vários pontos da planície de inundação do alto Rio Paraná. Foram realizadas amplificações através da técnica SPAR, que refletiu diretamente a distribuição de sequências repetitivas simples no genoma dos espécimes analisados. Foram obtidos perfis eletroforéticos das duas espécies, os quais apresentaram diferenças. Dessa forma, tornaram-se disponíveis marcadores diagnósticos, ou seja, espécie-específicos, que caracterizam as espécies. A técnica SPAR também tem gerado marcadores diagnósticos em outras espécies de peixes (LUCIO, 2002; ALMEIDA, 2005).

Os *primers* testados e selecionados para a amplificação do DNA via PCR produziram diferentes padrões de fragmentos SPAR, onde o número total de locos observados foi de 49. A quantidade de locos observados por *primer* variou de 13 a 21 e o tamanho dos produtos amplificados ficou entre 380 e 2200 pares de bases (pb).

A Figura 2 mostra o perfil eletroforético de alguns espécimes de *Steindachnerina insculpta* e *S. brevipinna*, analisados com o *primer* (GGAC)₃C. Marcadores moleculares exclusivos para cada espécie foram obtidos pela técnica de SPAR. Do total de 21 locos amplificados com esse *primer*, 11 foram exclusivos de *S. insculpta*, sendo 7 polimórficos e 4 monomórficos e 6 locos foram exclusivos de *S. brevipinna*, sendo 3 polimórficos e 3 monomórficos. Quatro locos foram compartilhados entre as duas populações: dois monomórficos e dois polimórficos.

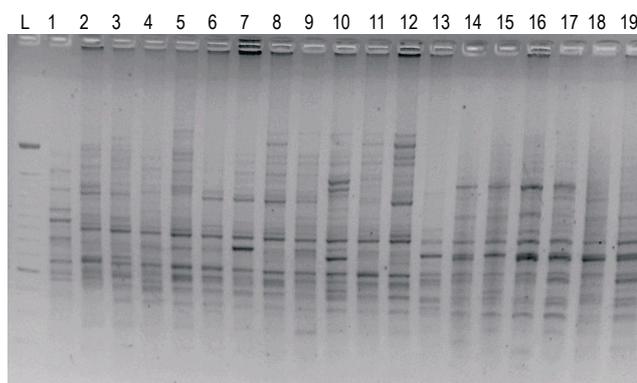


Figura 2 Perfil eletroforético de indivíduos analisados pela técnica SPAR com o *primer* (GGAC)₃C a partir de espécimes de *Steindachnerina insculpta* (colunas 1 a 12) e *S. brevipinna* (colunas 13 a 19). Observar a presença de marcadores exclusivos de *S. insculpta* e marcadores exclusivos de *S. brevipinna*. A coluna L contém os fragmentos marcadores de peso molecular (Ladder 100pb)

A Figura 3 mostra o perfil eletroforético de alguns indivíduos que tiveram seu DNA amplificado pela técnica de SPAR com o *primer* (GGAC)₃A. Na figura, observa-se a presença de alguns marcadores diagnósticos das duas espécies. Dentre os 15 locos obtidos com este *primer*, 7 foram exclusivos de *S. insculpta*, sendo 2 polimórficos e 5 monomórficos e 5 locos foram exclusivos de *S. brevipinna*, sendo 2 polimórficos e 3 monomórficos. Três locos foram compartilhados por ambas as populações, sendo 2 monomórficos e 1 polimórfico.

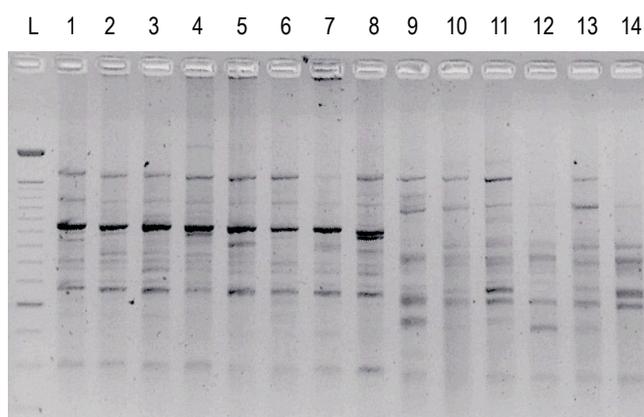


Figura 3 Perfil eletroforético de indivíduos analisados pela técnica SPAR com *primer* (GGAC)₃A a partir de espécimes de *Steindachnerina insculpta* (colunas 1 a 8) e *S. brevipinna* (coluna 9 a 14). A coluna L contém os fragmentos marcadores de peso molecular (Ladder 100pb)

A Figura 4 mostra o perfil eletroforético, utilizando a técnica de SPAR, de alguns indivíduos que tiveram seu DNA amplificado, com o *primer* (AAGC)₄. Dentre os 13 locos obtidos com este *primer*, 2 foram exclusivos de *S. insculpta*, sendo todos monomórficos e 2 locos foram exclusivos de *S. brevipinna*, sendo 1 polimórfico e 1 monomórfico. Nove locos foram compartilhados por ambas as populações, sendo 3 monomórficos e 6 polimórficos.

A grande quantidade de locos polimórficos observada indica uma acentuada variabilidade genética intra e interespecífica nas populações de *Steindachnerina*. Esses dados corroboram estudos anteriores utilizando a técnica RAPD (OLIVEIRA et al., 2002). Provavelmente o evento de introdução de *S. brevipinna* na região da planície de inundação do alto Rio Paraná ocorreu com um grande número de indivíduos, os quais representavam a variabilidade genética original da espécie.

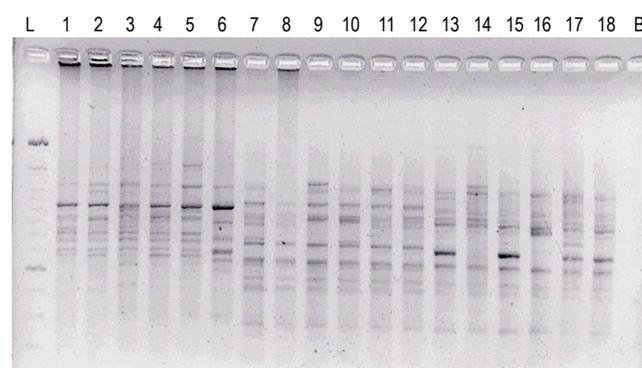


Figura 4 Perfil eletroforético de indivíduos analisados pela técnica SPAR com *primer* (GGAC)₃A a partir de espécimes de *Steindachnerina insculpta* (colunas 1 a 6) e com o *primer* (AAGC)₄ a partir de indivíduos de *S. insculpta* (colunas 7 a 12) e *S. brevipinna* (colunas 13 a 18). A coluna L contém os fragmentos marcadores de peso molecular (Ladder 100pb) e a coluna B, o controle negativo da reação

A grande quantidade de locos polimórficos observada indica uma acentuada variabilidade genética intra e interespecífica nas populações de *Steindachnerina*. Esses dados corroboram estudos anteriores utilizando a técnica RAPD (OLIVEIRA et al., 2002). Provavelmente o evento de introdução de *S. brevipinna* na região da planície de inundação do alto Rio Paraná ocorreu com um grande número de indivíduos, os quais representavam a variabilidade genética original da espécie.

Apenas um indivíduo com características morfológicas de *S. insculpta* apresentou em seu perfil eletroforético, com o *primer* (GGAC)₃A, marcadores exclusivos das duas espécies. É provável que este indivíduo seja um híbrido natural, o que indica que pode estar havendo cruzamento entre as duas populações de *Steindachnerina* da planície de inundação do alto Rio Paraná. A presença de marcadores moleculares espécie-específicos em indivíduos híbridos tem sido observada também por outros autores em diferentes grupos de peixes (ALMEIDA, 2005; ALVES, 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

Espécies de Curimatidae apresentam uma alta similaridade cariotípica, representada por $2n = 54$ cromossomos (VENERE; GALETTI JR., 1989) e a quebra do isolamento geográfico, causada pela submersão dos saltos de Sete Quedas, pode ter permitido a formação de híbridos naturais. Esses híbridos podem tornar-se inviáveis devido a diferenças gênicas e cromossômicas (FUTUYMA, 1997) e este fato poderia explicar o pequeno número de indivíduos encontrados na região.

Híbridos inviáveis não realizam retrocruzamentos com as espécies parentais e, dessa forma, não há riscos de homogeneização genética na região. Resultado semelhante também foi encontrado para essas duas populações da planície de inun-

dação do alto Rio Paraná com marcadores moleculares RAPD (OLIVEIRA et al., 2002).

4 CONCLUSÕES

A técnica SPAR, utilizada neste trabalho, tem se mostrado eficaz para a discriminação de espécies e identificação de possíveis híbridos naturais, gerando marcadores diagnósticos para as populações de Steindachnerina da planície de inundação do alto Rio Paraná.

As análises das populações de Steindachnerina da planície de inundação do alto Rio Paraná indicam que há ocorrência de híbridos naturais na região, mas como provavelmente estes são inviáveis, não há risco de extinção das populações locais por homogeneização genética.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; JULIO JR., H. F. Ameaça ecológica: Peixes de outras águas. **Ciência Hoje**, v. 21, n. 124, p. 36-44, 1996.
- AGOSTINHO, A. A. et al. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.) **A planície de inundação do Alto Rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá, PR: EDUEM, 1997.
- AGOSTINHO, A. A.; ZALEWSKI, M. **A planície alagável do Alto Rio Paraná: Importância e preservação**. Maringá, PR: EDUEM, 1996.
- ALMEIDA, G. C. A. **Análise genética via SPAR, de duas espécies do gênero Cichla introduzidas na bacia do Rio Paraná**. 2005. Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR, 2005.
- ALVES, F. **Análise da Potencialidade das Sequências de DNA ribossômico 5S como marcadores moleculares para espécies de tilápias (Perciformes, Cichlidade)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2005.
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. C. **Evolução e estrutura de populações do gênero Gymnotus (Pisces: Gymnotiformes)**. 1999. Tese (Doutorado em Biologia/Genética) - Instituto de Biociências USP, São Paulo-SP, 1999.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1997.
- GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 998-1006, 1994.
- LUCIO, L. C. **Caracterização Molecular e Variabilidade Genética em Populações de Hoplias aff. malabaricus da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná**. 2002. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 2002.
- MORIZOT, D. C. et al. Multispecies hybridization among native and introduced centrarchid basses in Central Texas. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 120, p. 283-289, 1991.
- OLIVEIRA, A. V. et al. Genetic diversity of invasive and native Cichla (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interespecific hybridization. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 260-277, 2006.
- OLIVEIRA, A. V. et al. Diversity and genetic distance in populations of Steindachnerina in the upper Paraná river floodplain of Brazil. **Genetica**, v. 115, p. 259-267, 2002.
- PERRY, W. L.; LODGE, D. M.; FEDER, J. L. Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. **Syst. Biol.**, v. 51, n. 2, p. 255-275, 2002.
- PIERCE, P. C.; VAN DEN AVYLE, M. J. Hybridization between introduced spotted bass and smallmouth bass in reservoirs. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, p. 939-947, 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCRIBNER, K. T.; PAGE, K. S.; BARTRON, M. L. Hybridization

in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological interference. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 293-323, 2001.

VENERE, P. C.; GALETTI JR, P. M. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the Curimatidae. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 12, p. 17-25, 1989.

WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. **FAO fish. Tech.**, v. 294, p. 1-318, 1988.

Recebido em: 15 agosto 2008

Aceito em: 05 fevereiro 2009