

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Diferenciação genética de populações do teleósteo migratório *Pseudoplatystoma
corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) na região do reservatório de Três Marias,
rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil.**

Carlos Eduardo Duarte Braga
Cíntia Garcia
Marcela Santos Procópio
Marina Cavalcanti
Naiara Silveira

BELO HORIZONTE
JUNHO - 2008

Diferenciação genética de populações do teleósteo migratório *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) na região do reservatório de Três Marias, rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil.

Abstract

A construção de usinas hidrelétricas, poluição dos rios e outras alterações ambientais estão sendo responsáveis pelo desaparecimento de várias espécies de peixes no mundo. O objetivo desse trabalho é analisar a população de *Pseudoplatystoma corruscans* na região da represa de Três Marias no rio São Francisco (Brasil) coletado em dois trechos com diferentes condições ambientais. Microsatélites serão usados para avaliar a variação genética nos trechos e entre os trechos. Considerando a importância econômica da pesca no rio São Francisco estes dados fornecerão importantes informações para o manejo de peixes, aquicultura e na conservação da população de peixes dessa espécie.

1- INTRODUÇÃO

Atualmente, já foram descritas mais de 24,600 espécies de peixes viventes compreendidas em 482 famílias e 57 ordens (Nelson, 1994). Dentre elas aproximadamente 23,000 espécies são de teleósteos, o que representa 96% de toda diversidade de peixes (Helfman *et al.* 1997). Dessa forma, esse grupo provavelmente é o maior e mais diversificado dentre todos vertebrados (Nelson, 1994). No Brasil, há mais de 3,000 espécies de peixes descritos, sendo o país com a maior riqueza de peixes de água doce do mundo (McAllister 1977). A ictiofauna do rio São Francisco é composta aproximadamente por 152 espécies (Travassos, 1960; Britski *et al.*, 1984; Sato & Godinho, 1999). Dentre elas, 8% são espécies que migram durante o período reprodutivo, sendo que sete delas são migradores de longa distância. Essas espécies pertencem às ordens Characiformes e Siluriforme (Lins *et al.*, 1997).

Pseudoplatystoma corruscans (Siluriformes - Pimelodidae) conhecido popularmente como surubim, é o maior e de maior valor comercial teleósteo piscívoro do rio São Francisco (Menezes 1956, Godinho *et al.* 1997). São peixes migratórios de longa distância (Agostinho *et al.* 2003; Diaz-Sarmiento and Alvarez-León 2003; Sato and Godinho 2003; Zaniboni Filho and Schulz 2003) que alcançam aproximadamente 3,3 m de comprimento e podem pesar mais de 100 kg (Ihering, 1946). Dados recentes têm

mostrado que a quantidade de pescado representada pelo surubim, no rio São Francisco, tem diminuído substancialmente (Godinho and Godinho 2003). Em uma importante região de pesca, o pescado de surubim diminuiu de 12 kg de peixe por dia em 1987, para 3 kg de peixe por dia em 1999 (Godinho *et al.* 1997). O surubim representava em 1987, 86% de todo pescado do São Francisco. Contudo, em 1999 essa espécie representava somente 26% do pescado. Dessa forma essa espécie já está listada como presumivelmente ameaçada de extinção no estado de Minas Gerais e segundo Godinho 2005, a construção de novas barragens no leito do São Francisco irá comprometer ainda mais o futuro da espécie.

A construção de hidrelétricas causa severos danos à fauna e ao regime físico do rio (Graig, 1999). O maior impacto sobre a ictiofauna é o impedimento dos movimentos migratórios durante a reprodução para a região do rio à montante da represa, dificultado o acesso às lagoas marginais onde ocorrem as desovas (Graig, 1999; Junk *et al.*, 1989; Junk & Welcomme, 1990). No Brasil, vários impactos sobre a diversidade de peixes já são relatados. No rio Paraná duas espécies de teleósteos foram extintas, *Piaractus mesopotamicus* e *Brycon orbignyanus* devido à construção do reservatório da hidrelétrica de Itaipu (Lowe-McConnel, 1987; Agostinho *et al.*, 1994; Agostinho & Zalewski, 1995). No rio São Francisco, a represa de Três Marias foi construída em 1960 com o principal objetivo de contenção das cheias e produção de energia elétrica (Godinho & Godinho, 2003). Contudo esse barramento causou drásticos impactos causados principalmente pela redução do fluxo de água, diminuição da temperatura e da oxigenação da água. Alterações histológicas nas gônadas da espécie *Prochilodus marggravii* revelaram distúrbios na reprodução em espécimes logo a jusante da barragem causada principalmente pela redução da temperatura da água o que não ocorre com espécimes à jusante do rio Abaeté onde as condições de temperatura e oxigenação já foram restabelecidas (Sato *et al.*, 1995).

Contudo, não há informações sobre o efeito da construção de represas na estrutura genética da população de peixes migratórios neotropicais. O livre deslocamento dos peixes pelo rio é impedido pela represa, o que pode causar variação genética e mudança de frequência de alelos (Hatanaka *et al.*, 2003). Além disso, as mudanças físicas geradas criam um ambiente diferente a montante e a jusante da represa, o que pode influenciar também na variação genética dos animais (Sato & Osório, 1986).

Um dos marcadores moleculares mais utilizados são os microsátélites ou simples seqüências de repetição (SSRs) o qual correspondem a seqüências repetidas de 1-6 pares

de bases presentes em todos os genomas, tanto procarióticos quanto eucarióticos estudados até agora (Zane, Bargelloni & Patarnello, 2002). Estão presentes em regiões codificadoras e não codificadoras do DNA e são caracterizadas por um alto grau de polimorfismo. Dessa forma, devido ao alto grau de polimorfismo, os SSRs estão sendo poderosos mapeadores genômicos (Schuler *et al* 1996; Knapik *et al.* 1998) e úteis ferramentas utilizadas para avaliar diferenciação genética de populações e auxiliar na conservação de recursos biológicos (Jarne & Lagoda 1996).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é isolar e caracterizar novos microsátélites em *Pseudoplatystoma corruscans* e analisar a variabilidade genética dos espécimes em dois trechos do Rio São Francisco em diferentes condições ambientais. Estudos como esse possui importância relevante na conservação da espécie e auxiliam no manejo e na aquicultura.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar novos microsátélites em *Pseudoplatystoma corruscans* e analisar a variabilidade genética dos espécimes em dois trechos do Rio São Francisco, um a jusante da represa de Três Marias e outro na confluência com o rio Abaeté, em diferentes condições ambientais.

2.2 Objetivos Específicos

- ⇒ Caracterização de loci de microssátélites da espécie *Pseudoplatystoma corruscans* a partir do DNA genômico extraído pela Técnica de Fenolclorofórmio, digerindo-o com enzimas de restrição e o submetendo a eletroforese.
- ⇒ Amplificação das bandas encontradas entre 400-1,200 pares de bases utilizando primers previamente descritos com a finalidade de avaliar a variação genética em cada trecho e entre os trechos.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA

As coletas serão realizadas durante três anos sucessivos (2008, 2009, 2010) no mês de setembro durante o período reprodutivo. As coletas ocorrerão no rio São Francisco em dois trechos sendo um deles a jusante da represa de Três Marias e o outro na confluência do rio São Francisco com o rio Abaeté aproximadamente 27km de distância do primeiro trecho. Em cada ano serão coletados 44 espécimes, 22 em cada trecho, totalizando no período de três anos 132 espécimes. Para o deslocamento no rio será utilizado um barco previamente equipado e para a captura dos exemplares serão utilizadas redes de malhar. Os peixes foram dissecados e fragmentos do fígado foram retirados para a extração de DNA por meio do método fenol-clorofórmio.

3.2 PREPARAÇÃO DO TECIDO

Fragmentos do fígado serão fixados em formol 10%, desidratados em concentrações decrescentes de etanol (70%,80%,90%,100%) e embebidos em parafina. Com o auxílio de um micrótomo (Laboratório de apoio à Pós Graduação do Departamento de Biologia Celular –UFMG) serão obtidos cortes de 10mm e estes serão transferidos para tubos de centrifugação de 1,5ml. Serão adicionados a cada tubo de centrifugação, 1 ml de xilol aquecido a 65°C e mantido por 10 minutos. O tubo será então centrifugado a 14.000 xg durante 5 minutos, desprezado o sobrenadante, seguido de novas trocas de xilol aquecido, até a remoção completa da parafina. O precipitado será reidratado com sucessivas trocas de etanol absoluto, etanol 95% e 70% em água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), sendo cada troca precedida de homogeneização e centrifugação a 14.000 xg durante 5 minutos. 7,4 e EDTA 1 mM, pH 8,0) e mantido a 4°C até quantificação. Os precipitados obtidos serão submetidos às técnicas de extração de DNA descrita a seguir.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA FENOL-CLOROFÓRMIO

O protocolo para a extração de DNA com fenol foi baseado no método descrito por ISOLA *et al.* (1994). Serão adicionados ao precipitado 200 ml de tampão de lise (NaCl 1 M; Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 10%) estéril e proteinase K (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). Na concentração final de 500 µm/ml. Os tubos serão mantidos à 55° e banho Maria (Precision, vwr, OH, EUA) por 3-5 dias até a completa dissolução do precipitado. Será adicionada proteinase K (10- 30µl de uma solução estoque a 250mm/ml) em intervalos de 20h e os tubos serão invertidos uma vez ao dia. Para a inativação da proteinase K, os tubos serão incubados à 95° durante 10 minutos.

Após a inativação serão adicionados 1 ml de fenol saturado e tamponado (pH 8,0), e os tubos centrifugados a 4.200 xg por 20 minutos, quando o sobrenadante será transferido para um outro tubo. Serão então acrescentados 1 ml de fenol, clorofórmio, e álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizados, e centrifugado a 4,200 xg por 20 minutos. O sobrenadante será novamente transferido para outro tubo de 1,5 ml. Para precipitação do DNA genômico, serão adicionados 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado (-20°) e 1/10 do volume de acetato de amônio 7 M e o tubo será deixado overnight a -20°. O tubo será centrifugado a 19.600 xg durante 20 minutos, o precipitado de DNA lavado em etanol 70°, e após evaporação do etanol a temperatura ambiente, o precipitado será dissolvido em 30-50 µm de tampão TE (TRIS-HCL 10 mM, pH 8,0) e será mantido a 4° até a realização do PCR.

3.4 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITE

Esse método desenvolvido por Revaldaves *et al.* (2005) descreve uma técnica para isolamento e caracterização de loci de microssatélites da espécie *Pseudoplatystoma corruscans*.

Os loci dos microssatélites serão isolados de uma biblioteca enriquecidos com loci de dinucleotídeos, seguindo os protocolos de Hamilton *et al.* (1999).

Aproximadamente 10 µg de DNA de um indivíduo da espécie *P. corruscans* será usada a partir da extração por fenolclorofórmio, descrito em ISOLA *et al.*(1994). O DNA será digerido com Dra I e Ssp I e será feita eletroforese em 2% low-melting agarose gel.

Os fragmentos de DNA que alcançarem de 400 a 1.200 pb (pares de base) serão extirpado do gel purificado com fenol-clorofórmio, e ligados a adaptadores:

Snxr 5'-P-GCTTCTGCTAGCAAGGCCTTAGA-3' e

Snx 5'-CTAAGGCCTTGCTAGCAGAAGC-3'.

O enriquecimento será feito com oligonucleotídeos (AC)₁₈ e (AG)₁₈ biotinizados e beads magnéticos encapados com estreptavidina (Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particles, Promega). O DNA recoberto será amplificado usando os adaptadores Snx como primers.

Os fragmentos amplificados serão ligados no pGEM-T (Promega) e então usados na transformação de células DH5α *Escherichia coli* (Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells, Invitrogen).

Os DNAs plasmidiais serão isolados usando fenol-clorofórmio e seqüenciados com um seqüenciador automático ABI Prism 377 usando o BigDye Terminator kit (Applied Biosystems). Os primers flanqueadores foram feitos usando o software PRIMER 3 (Rozen & Skaletsky, 1998).

3.5 - AMPLIFICAÇÃO DOS LOCI DE MICROSATÉLITE

Serão coletados 132 indivíduos em três anos consecutivos nas regiões A e B. Serão utilizados como controle a análise de 3 loci de microssatélites de *Pseudoplatystoma corruscans* descritos previamente por Eloisa Revaldares, Luiz H. G. Pereira, Fausto Foresti e Cláudio Oliveira (2005). As reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram feitas com um volume total de 15µl contendo 100 ng de DNA, 200µM de dNTPs , 1.5-2.0 mM de MgCl₂, 5 pmol de cada primer, tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂) e 1U de Taq DNA polimerase (Labtrade do Brasil) Amplificações foram realizadas em um MJ research model PTC-100 thermal cycler com o seguinte programa: inicialmente ocorre desnaturação a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por min. Os

primers foram marcados fluorescentemente com NED (PE Applied Biosystems) e os produtos da PCR passaram por um seqüenciador automático Perkin Elmer ABI 377.

Tabela 1 Três loci de microssatélite de *Pseudoplatystoma corruscans* descritos por Eloisa Revaldares, Luiz H. G. Pereira, Fausto Foresti e Cláudio Oliveira (2005).

Locus/ Accession no.	Repeat motif	Primers (5'-3')
Pcor1 AY737063	(TC) ₉ GC(TC) ₉	F: AAACCCGAGGATAACCAGTC R: CAGCGTGCTACTAACACAAAC
Pcor2 AY737064	(AG) ₁₉	F: GATATGCCAAATAAGAAGGTC R: TCTTCTGGCTTTTCCTCCTCT
Pcor5 AY737067	(TC) ₈ CC(TC) ₁₅	F: GACTAAGATTACACAGAGATTC R: CTTGGTGGGAAACAGGC

4- CRONOGRAMA

	1º Trimestre			2º Trimestre			3º Trimestre			4º Trimestre		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Coleta de 44 indivíduos nas regiões a montante e a jusante da represa de Três Marias (15 dias)	x											
Obtenção dos materiais/reagentes e verificação de equipamentos que serão utilizados (25 dias)	x											
Extração de DNA (40 dias)		x	x									
Digestão e eletroforese do DNA extraído - duas semanas (14 dias)				x								
Purificação dos fragmentos de DNA - dois meses (60 dias)				x	x	x						
Amplificação do DNA purificado - duas semanas (14 dias)						x						
Clonagem em Escherichia coli do DNA amplificado - três semanas (21 dias)						x						
Purificação do DNA clonado - dois meses (60 dias)							x	x				
Sequenciamento do DNA plasmidial clonado - tres meses (90 dias)							x	x	x			
Amplificação e análise dos loci (50 dias)										x	x	x

Este projeto será realizado em três anos, portanto este cronograma se repetirá a cada ano.

5- ORÇAMENTO

ORÇAMENTO						
Produto	Fornecedor	Quantidade	Valor em Dólar		Valor em Real	
			Unitário	Total	Unitário	Total
Agarose Grau GTG	LGC Biotecnologia	9	-	-	R\$ 400,00	R\$ 3.600,00
Biotina	Calbiochem	3	\$ 95,00	\$285,00	\$218,50	R\$ 655,50
Dra I	Recombinant DNA/Protein Core Facility	3	\$ 39,00	\$ 117,00	R\$ 89,70	R\$ 269,10
DYEnamic ET DYE Terminator Kit (Mega BACE)	GE Healthcare	1	-	-	R\$ 4.340,00	R\$ 4.340,00
Ethidium Bromide	GE Healthcare	1	-	-	R\$ 331,00	R\$ 331,00
dNTPs	BioChain	10	\$ 62,00	\$ 620,00	R\$ 142,60	R\$ 1.426,00
Primers e Oligonucleotídeos	Prodinol	-	-	-	-	R\$ 4.000,00
Taq DNA polimerase com tampão	LGC Biotecnologia	1	-	-	R\$ 135,00	R\$ 135,00
pGEM-T	Promega	5	\$ 110,00	\$ 550,00	R\$ 253,00	R\$ 1.265,00
Ssp I	Recombinant DNA/Protein Core Facility	3	\$ 50,00	\$ 150,00	R\$ 115,00	R\$ 345,00
Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles	Promega	3	\$ 344,00	\$ 1.032,00	R\$ 791,20	R\$ 2.373,60
Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol	GE Healthcare	1	-	-	R\$ 566,00	R\$ 566,00
Sais	GE Healthcare	1	-	-	R\$ 3.000,00	R\$ 3.000,00
Spermine	Calbiochem	1	\$120,00	\$120,00	R\$ 276,00	R\$ 276,00
Spermidine	Calbiochem	1	\$62,00	\$62,00	R\$ 62,00	R\$ 62,00
Hospedagem	Pensão do Tião João	5	-	-	R\$ 840,00	R\$ 4.200,00
Transporte	São Geraldo	5	-	-	R\$ 300,00	R\$ 1.500,00
Alimentação	Marmitas da Titia Elza	5	-	-	R\$ 630,00	R\$ 3.150,00
TOTAL						R\$ 31.494,20

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aljanabi, S. M. & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, vol 25: 22, 4692-4693.

Agostinho, A.A., H.F. Julio Jr & M. Petrere. 1994. Itaipu Reservoir, (Brazil): Impacts of the impoundment on the fish fauna and fisheries. pp. 171-184. *In*: I.G. Cowx (ed.) *Rehabilitation of Freshwater Fisheries*, Fishing News Books, Oxford.

Agostinho, A.A. & M. Zalewski. 1995. The dependence of fish community structure and dynamics on floodplain and riparian ecotone zone in Parana River, Brazil. *Hydrobiologia* 303: 141-148.

Agostinho A.A., Gomes L.C., Suzuki H.I. and Júlio Jr H.F. 2003. Migratory fishes of the upper Paraná River Basin, Brazil. *In* Carolsfeld J., Harvey B., Ross C. and Baer A. (Ed.). *Migratory fishes of South America*, pp. 19–98. Victoria: World Fisheries Trust.

Britski, H. A., Y. Sato, and A. B. S. Rosa. 1984. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco. Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca 143 p.

Craig, J.F. Large Dams and Freshwater Fish Biodiversity. Contributing Paper prepared for Thematic Review II.1. Dams, ecosystem functions and environmental restoration. (1999).

Diaz-Sarmiento J.A. and Alvarez-León R. 2003. Migratory fishes of the Colombian Amazon. *In* Carolsfeld J., Harvey B., Ross C. and Baer A. (ed.). *Migratory fishes of South America*, pp. 303–344. Victoria: World Fisheries Trust.

Godinho, H. P., M. O. T. Miranda, A. L. Godinho, and J. E. Santos. 1997. Pesca e biologia do surubim *Pseudoplatystoma corruscans* no rio São Francisco. *In* Surubim. Miranda, M. O. T. (Org.). IBAMA, Belo Horizonte, Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19:27–42

Godinho A.L. and Godinho H.P. 2003. Breve visão do São Francisco. *In* Godinho H.P. and Godinho A.L. (ed.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*, pp. 15–24. Belo Horizonte: PUC Minas.

Godinho A.L. Life History Movements and Spawning of São Francisco River Fishes, Brazil, 2005.

Hamilton, M. B.; Pincus, E. L.; DiFiorie, A. & Fleischer, R. C. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. Short technical reports. *Biotechniques*, 27, 500–507.

Hatanaka, T. Galleti Jr, P.M. 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structure populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 26.1, pp.19-25.

Helfman, G.S. *Fish Conservation: The decline and Restoration of Biodiversity*. Island Press.

Ihering R. 1934. *Sobre a vida de nossos animais: fauna do Brazil*. São Leopoldo: Rotermond.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. *et al.* Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

Jarne P, Lagoda P.J.L (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 424–429.

Junk, W. J., P. B. Bailey, and R. E. Sparks. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Can Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 106:110–127.

Junk, W. J., and R. L. Welcomme. 1990. Floodplains. *In Wetlands and shallow continental water bodies*. Patten, B.C. The Netherlands, SPB Academic Publishing, Vol.1, 491–524 p.

Knapik EW, Goodman A, Ekker M *et al.* (1998) A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, 18, 338–343.

Lins, L.V., A. B. M. Machado, C. N. R. Costa, and G. Hermann. 1997. Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial de fauna ameaçada de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 55 p.

Lowe-McConnell, R.H. 1987. *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*. Cambridge University Press, Cambridge. 382 pp.

McAllister D.E., Hamilton A.L. and Harvey B. 1997. Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. *Sea Wind* 11: 140p.

Menezes, R. S. 1956. Pesca e piscicultura no vale do São Francisco. *Bol. Secr. Agric. Ind. Com. Est. Pernambuco*, 23(314): 43–105.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras*, v. 15, n. 4, p. 314-319, out./dez. 2001.

Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World*. 3^a ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. 620p.

Revaldaves, E.; Pereira, L. H. G.; Foresti, F. & Oliveira, C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 5, 463-465.

Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sato, Y & Osorio, F.M.F. A pesca profissional na represa de Três Marias, MG em 1986. V Encontro Anual de Aqüicultura de Minas Gerais, pp. 91.

Sato Y, Miranda, M.O.T., Bazzoli, N. Rizzo, E. 1995. Impacto do reservatório de Três Marias sobre a piracema à jusante da barragem. XI Encontro Brasileiro de Ictiologia, pp2.

Sato, Y., and Godinho, H. P. 1999. Peixes da bacia do rio São Francisco. *In Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Lowe-McConnell (Ed.). Tradução de A. E. A. M. Vazzoler, A. A. Agostinho, and P. T. M. Cunningham. EDUSP, São Paulo, 401–413 p.

Sato Y., Godinho H.P. 2003. Migratory fishes of the São Francisco River. *In* Carolsfeld J., Harvey B., Ross C. and Baer A. (Ed.). *Migratory fishes of South America*, pp. 195–232. Victoria: World Fisheries Trust.

Schuler, G.D, Bogusky, M.S., Stewart, E.A *et al.* 1996. A gene map of the human genome. *Science*, 274. pp. 540-546.

Travassos, H. 1960. Catálogo dos peixes do vale do rio São Francisco. *Bol. Soc. Cear. Agron.*, 1:1–66.

Zane, L. Bargelloni, L. & Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11. pp. 1-16.

Zaniboni Filho E. and Schulz U. 2003. Migratory fishes of the Uruguay River. *In Migratory fishes of South America*, pp. 157–193. Victoria: World Fisheries Trust.