

ESTUDO GENÉTICO DA PIRAPUTANGA *Brycon microlepis*

Lenicy Lucas de Miranda Cerqueira¹
Fabiana Aparecida Caldart Rodrigues²
Claumir Cesar Muniz²
Pábila Stephanie³
Amanda Guimarães Cardoso³
Denyse Cavalcante Lago⁴

RESUMO: O bioma pantanal abriga grande biodiversidade de espécies de peixes, que além da sua relevância ecológica também são de grande importância para a alimentação e renda de famílias e empresas ligadas ao turismo pesqueiro, como é o caso da piraputanga (*Brycon microlepis*), distribuída pela bacia do Paraguai e Pantanal. Este trabalho objetivou buscar novas informações que possibilitem uma melhor compreensão da diversidade genética da piraputanga através de uma investigação citogenética e molecular. O número diplóide encontrado foi de $2n= 50$ cromossomos. Foi realizada a técnica de banda C e as NORs foram evidenciadas pela coloração de nitrato de prata. Foram coletadas amostras em diversos municípios do estado de Mato Grosso, como: Cuiabá, Barão de Melgaço, Santo Antônio de Leverger, Barra do Bugres e Cáceres. Um banco de DNA foi montado com estas amostras. Os *primers* de microssatélites utilizados foram descritos para outra espécie (*Brycon opalinus*). Os resultados podem futuramente possibilitar uma melhor compreensão da variabilidade genética e do mecanismo ecológico da espécie.

Palavras-Chave: Piraputanga, banda C, NORs, microssatélites

GENETIC STUDY PIRAPUTANGA *Brycon microlepis*

ABSTRACT: The Pantanal biome is home to great biodiversity of fish species, which beyond its ecological relevance are also of great importance to the food and income of families linked to the fishing and tourism businesses, such as piraputanga (*Brycon microlepis*), distributed the basin of Paraguay and Pantanal. This work aims to seek new information that allows a better understanding of the genetic diversity piraputanga through a cytogenetic and molecular investigation. The diploid number was $2n= 50$ chromosomes. The C-banding technique and NORs evidenced by silver nitrate staining was performed. Samples were collected in several counties of the state of Mato Grosso, as Cuiabá, Barão de Melgaço, Santo Antônio do Leverger, Barra do Bugres and Cáceres. A bank of DNA in these samples was mounted. The microsatellite *primers* used were described for other species (*Brycon opalinus*). The results can further enable a better understanding of the genetic variability and the ecological mechanism of species.

Key-words: Piraputanga, C-band, NORs, microsatellites

¹ Docente Instituto de Biociências, campus Cuiabá, UFMT. lenicy@yahoo.com.br

² Docentes Depto. Ciências Biológicas, campus Cáceres, UNEMAT. facaldar@gmail.com; claumir@unemat.br

³ Discentes do curso de Ciências Biológicas, campus Cuiabá, UFMT

⁴ Mestranda FMRP, USP.

INTRODUÇÃO

As inúmeras bacias hidrográficas da América do Sul fazem do grupo dos peixes uma fonte de recurso explorável altamente variada, porém o conhecimento desta ictiofauna ainda é muito escasso, deixando muitos aspectos com lacunas, como os aspectos biológico, genético, ecológico, biogeográfico entre outros (Freitas, 2010).

Os rios que drenam a bacia do Pantanal abrigam cerca de 270 espécies de peixes (Britski *et al.*, 2007) das quais, cerca de 10 a 15 espécies tem utilização econômica (Hilsdorf *et al.*, 2006).

A família Characidae é a maior e a mais complexa dentre as famílias da ordem Characiformes, englobando a maior parte dos peixes de água doce do Brasil (Nelson 1994; Eschmeyer & Fong, 2010) e a subfamília Bryconinae destaca-se como um grupo de ampla distribuição geográfica, da América do Sul a América Central (Britski *et al.*, 1999), região das principais bacias hidrográficas brasileiras tais como Amazônica, Paraná, Paraguai e Araguaia-Tocantins (Antunes *et al.*, 2010). A subfamília é composta por 43 espécies, sendo que 41 destas estão compreendidas no gênero *Brycon* (Müller & Troschel, 1844 *apud* Paes, 2011).

Apesar da importância ecológica e comercial esses peixes são extremamente sensíveis a alterações no ambiente natural (Sanchez, 2007). A conservação da diversidade genética é primordial para a sobrevivência em longo prazo da espécie, a manutenção do *pool* gênico com suas variabilidades é extremamente necessária para a adaptação da espécie em diferentes localidades e o estudo dessa variabilidade genética é fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável e fundamental nos estudos de biologia básica aplicada (Bert *et al.*, 2002).

Nesse sentido, a citogenética tem sido utilizada em peixes para a classificação taxonômica, para análise de tendências evolutivas, filogenia e rearranjos cromossômicos, estudos de biodiversidade, caracterização de polimorfismo sexual para determinar hibridizações e melhorar a produção e viabilidade de genótipos (Lopez, 2008). No gênero *Brycon* apenas nove possuem descrição cromossômica, representando 25% das espécies (Mariguela *et al.*, 2010).

Por outro lado, a caracterização das sequências de microssatélites em espécies de água doce é de extrema importância para estudos de conservação, com o estudo da variabilidade das populações.

O objetivo deste trabalho foi avaliar geneticamente a piraputanga (*Brycon microlepis*) no estado de Mato Grosso, buscando novas informações para a posterior conhecimento de sua diversidade genética, informação esta importante para o entendimento da dinâmica de suas populações naturais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ambiente Natural

Foram coletadas 128 amostras em diversos municípios no estado de Mato Grosso (Figura 1). De todos os indivíduos foram obtidas amostras de nadadeiras para extração de DNA e 10 indivíduos utilizados para análises citogenéticas. Os peixes foram capturados utilizando vara e anzol e com a ajuda de pescadores profissionais.

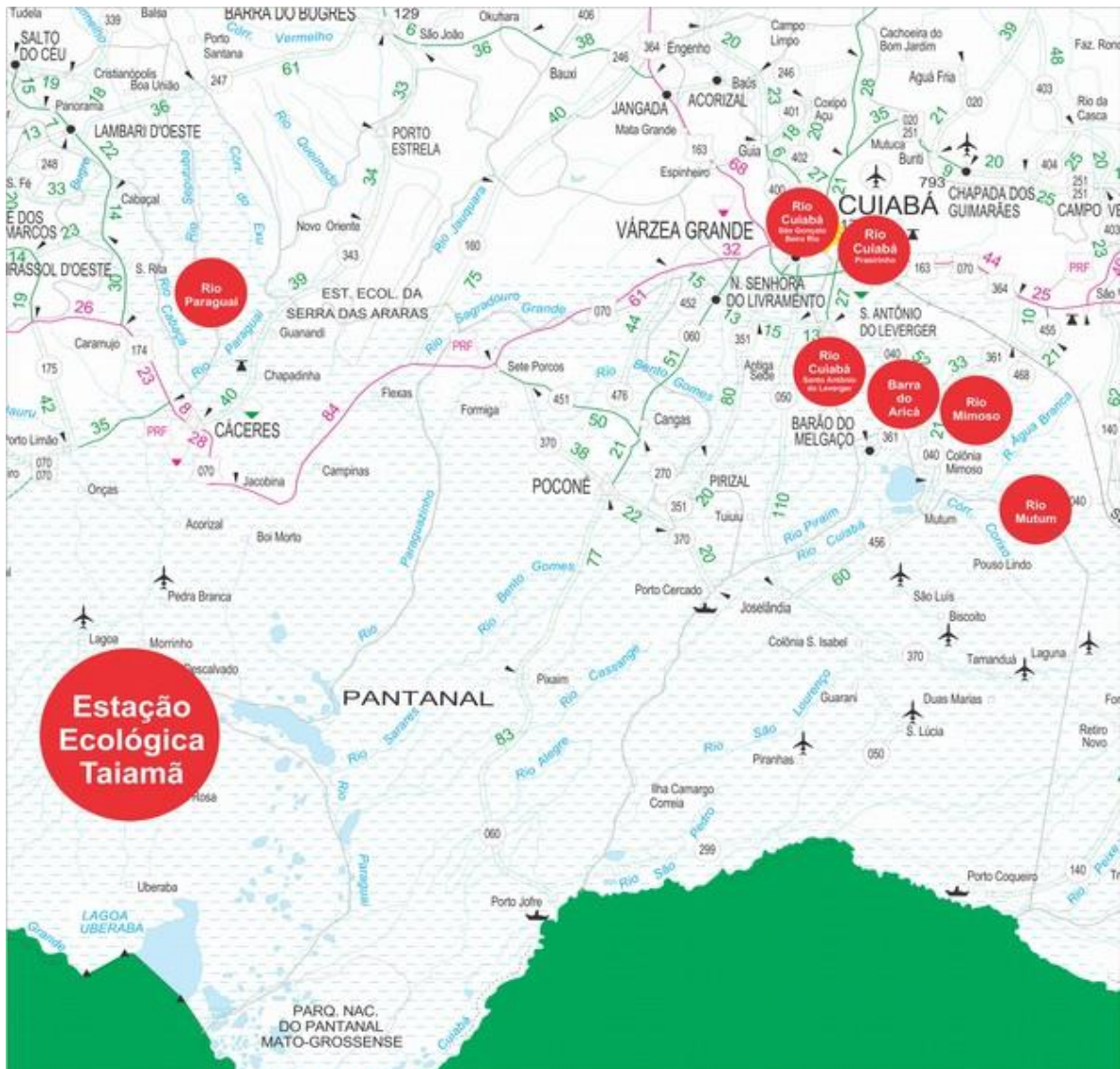


FIGURA 1: Mapa dos locais de coleta de piraputangas (*Brycon microlepis*) no Mato Grosso-MT- Brasil, o período de 2010 a 2014.

Análises Citogenéticas

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos de peixes *in vivo* foi a descrita por Foresti *et al.* (1981) e utilizada com algumas adaptações.

Para a visualização das Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs) foi empregada a técnica de impregnação pelo nitrato de prata (Howell & Black, 1980).

Para a observação do bandeamento C foi realizada a técnica de detecção da heterocromatina constitutiva (Sumner, 1972).

As preparações foram observadas em microscópio óptico binocular, em que as melhores metafases foram fotografadas. A nomenclatura dos cromossomos, com base na posição do centrômero, foi estabelecida segundo Levan *et al.* (1964).

Análises Moleculares

A extração de DNA foi realizada a partir de fragmentos da nadadeira caudal dos exemplares coletados, estas conservadas em etanol. A técnica utilizada foi a extração de DNA por tampão salino com algumas adaptações, de acordo com Aljanabi & Martinez (1997). Para a quantificação do DNA foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o corante *gel loading buffer (GelRed)*.

Foram utilizados cinco *loci* microssatélites descritos por Barroso *et al.* (2003), BoM1, BoM2, BoM7, BoM12 e BoM13. Para a visualização dos produtos da amplificação foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% não-desnaturante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Citogenética

O número diplóide encontrado foi de $2n= 50$ cromossomos (figura 2). Os cromossomos foram classificados em metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos.

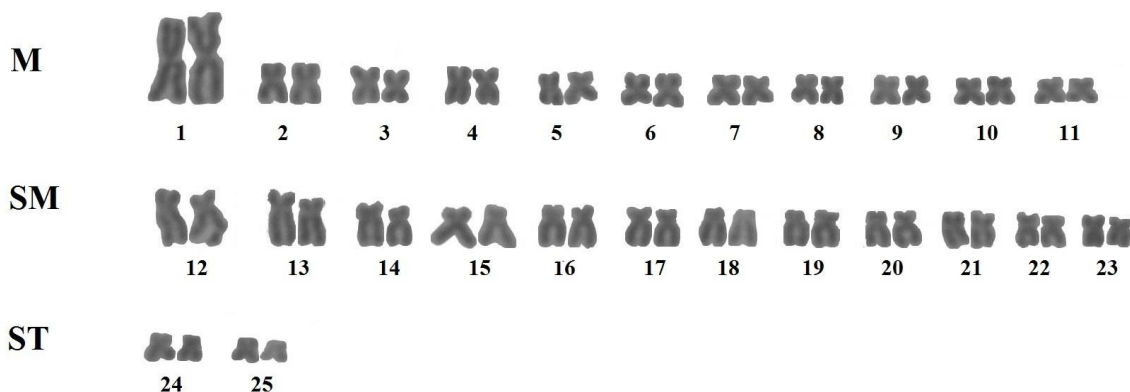


FIGURA 2. Cariótipo de *Brycon microlepis* ($2n=50$ cromossomos). M = Metacêntrico. SM = Submetacêntrico. ST = Subtelocêntrico.

Estudos cromossômicos anteriores em representantes do gênero *Brycon* revelaram significativa estabilidade cariotípica, caracterizado pelo mesmo número cromossômico ($2n= 50$) (Margarido & Galetti-Junior, 1999; Paes, 2011).

Todas as espécies de Bryconinae analisadas até então apresentam um complemento cariotípico formado por 50 cromossomos (Margarido & Galetti-Junior, 1999; Mariguela *et al.*, 2010), indicando que esta subfamília é caracterizada por uma grande estabilidade cariotípica em nível numérico.

De acordo com Daniel-Silva, (2001) todas as espécies de *Brycon* até hoje estudadas, apresentam um número fundamental alto, com valores de 94 a 100, sendo que *B. amazonicus* e *B. hilarii* mostraram grande variação em suas fórmulas cariotípicas o que pode caracterizar rearranjos cromossômicos das diversas populações (Mariguela *et al.*, 2010).

Uma característica citogenética predominante para as espécies do gênero de *Brycon* é a presença do primeiro par cromossômico maior que os demais, sendo este metacêntrico, podendo ser utilizado como marcador cromossômico para a família Bryconinae (López *et al.*, 2008; Mariguela *et al.*, 2010). Outra característica predominante para o gênero é o padrão da heterocromática constitutiva, onde seu primeiro par de cromossomos metacêntricos possuem marcações pericentroméricas em ambos os braços cromossômicos (Margarido & Galetti-Junior, 1999; Mariguela *et al.*, 2010; Levan *et al.*, 1964). No entanto, no restante do complemento padrão, há grandes divergências entre a distribuição de heterocromatina constitutiva, o que pode representar uma importante ferramenta na caracterização e diferenciação das espécies, constituindo assim, em um importante marcador citogenético para o gênero *Brycon* (Margarido & Galetti-Junior, 1996).

Na realização da técnica de detecção da heterocromatina constitutiva foram encontradas bandas de marcações nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos (Figura 03), resultado também encontrado em estudos anteriores realizados em espécies do mesmo gênero e em piraputangas coletadas apenas do rio Cuiabá, como no trabalho realizado por Margarido & Galetti-Junior (1999).

Almeida-Toledo *et al.* (1996) descreve que sítios de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs) aparentam ser conservados no gênero *Brycon*, em um par cromossômico comum, resultado também encontrado na realização da técnica de impregnação pelo nitrato de prata (Howell & Black, 1980) nos exemplares estudados de *Brycon microlepis* (Figura 04).

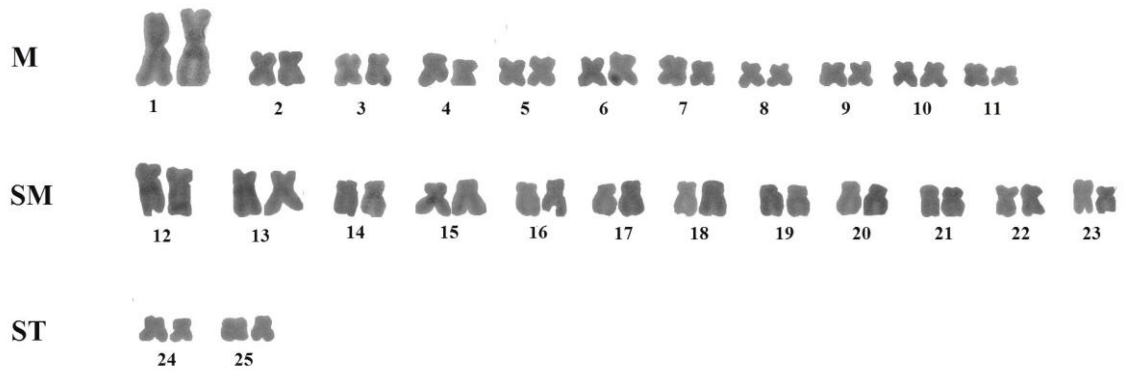


FIGURA 03. Cariótipo de banda-C de *Brycon microlepis* mostrando os cromossomos e suas bandas de marcações. M = Metacêntrico. SM = Submetacêntrico. ST = Subtelocêntrico.

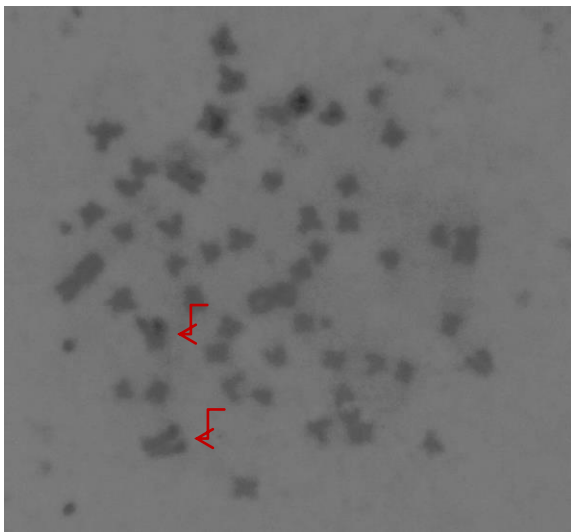


FIGURA 04. Foto de uma metáfase de *Brycon microlepis* na técnica de impregnação pelo nitrato de prata mostrando os sítios de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs) conservado em um par cromossômico comum, indicados pelas setas.

Análise Molecular

Atualmente existe um banco de DNA de *Brycon microlepis*, possibilitando além deste, outros estudos sobre a espécie. Segundo Ryder *et al.*, (2000) para a minimização do decréscimo populacional, dentre as várias estratégias de conservação, destaca-se a criação de bancos de DNA.

As amplificações sofreram variações na quantidade de DNA e também nos reagentes. Além disso, foram feitas tentativas de alterações no programa do termociclador e a aplicação do gradiente, mas sem resultados satisfatórios.

Os *loci* testados apresentaram rastros de DNA degradado e a maioria das amostras não apresentaram bandas. Os *primers* BoM7 e BoM12 tiveram melhores resultados na amplificação, formaram bandas fracas. Em um estudo realizado por Rossini *et al.*, (2010) foram dez *loci* descritos para duas espécies de *Brycon* (*Brycon hilarii*, Sanches & Galetti

2006 e *Brycon opalinus*, Barroso *et al.*, 2003), onde apenas cinco *loci* mostraram padrões satisfatórios de amplificação em *Salminus franciscanus*.

Silva *et al.*, (2011) verificou a amplificação cruzada utilizando seis pares de *primers* para *locus* de microssatélites desenvolvidos a partir da espécie *Astyanax mexicanus* em outras oito espécies do gênero *Astyanax*, alguns *loci* de microssatélites amplificaram adequadamente demonstrando certo grau de polimorfismo.

Vários trabalhos têm demonstrado resultados eficazes na amplificação heteróloga. Barroso, (2003) caracterizou sete *primers* para *Brycon opalinus* e também testou em outras quatro espécies de *Brycon* inclusive *B. microlepis*, os resultados foram satisfatórios devido à proximidade filogenética entre as espécies desse gênero.

Matsumoto & Hilsdorf, (2009) utilizaram marcadores microssatélites para avaliar a estrutura genética de populações selvagens de *Brycon insignis*, utilizando *loci* microssatélites caracterizados para *Brycon opalinus* e *Brycon cephalus*.

Um estudo realizado por Rodriguez-Rodriguez *et al.*, (2010) avaliou a diversidade genética de um lote de *Brycon orbignyanus* usado em programas de reprodução, com cinco *loci* microssatélites descritos para *Brycon opalinus* os resultados mostraram que há uma variabilidade genética intra-populacional.

Rossini (2010) testou 29 *loci* microssatélites nas análises populacionais de *Salminus brasiliensis*, sendo 16 descritos para *S. franciscanus*, seis para *Brycon hilarii* e sete para *Brycon opalinus* onde demonstraram excelente padrão de amplificação e alto polimorfismo.

Em um recente estudo Sanches *et al.*, (2012) realizou uma análise genética populacional utilizando cinco microssatélites heterólogos descritos para *Brycon hilarii* (Sanches & Gatetti 2006) em *Brycon orthotaenia*, e dez locos microssatélites específicos para *Prochilodus argenteus*.

A amplificação heteróloga consiste na transferabilidade de *loci* microssatélites, ou seja, na utilização de *primers* inicialmente desenvolvidos para uma espécie em outra com certa proximidade taxonômica. Sanches & Galetti (2006), utilizaram *primers* específicos de *Brycon hilarii* e realizaram ensaios de transferabilidade em cinco diferentes espécies do gênero *Brycon*: *B. orthotaenia*, *B. orbignyanus*, *B. falcatus*, *B. cephalus* e *B. insignis*, obtendo 89% de sucesso de transferabilidade nas espécies relacionadas.

Do mesmo modo, Barroso *et al.* (2003) obteve 100% de sucesso de amplificação de sete *loci* microssatélites em quatro espécies relacionadas: *B. orbignyanus*, *B. cephalus*, *B. lunddi* e *B. microlepis*. Realizando o mesmo procedimento com um peixe de proximidade filogenética menor, do gênero *Salminus*, porém também da família Characidae, Rossini *et*.

al testou a transferabilidade de sete e três *loci* microssatélites de *B. opalinus* e *B. hilarii* respectivamente, na espécie de dourado *Salminus franciscanus*. Cerca de 50% dos *loci* testados demonstraram potencial de aplicação como marcadores eficientes para a espécie.

Estudos que utilizam microssatélites de táxons relacionados demonstram ser eficazes, Sanches & Galetti, (2006) utilizaram *primers* específicos de *Brycon hilarii* em outras cinco espécies do gênero *Brycon* obtendo resultados satisfatórios. Matsumoto & Hilsdorf (2009) usaram locos de *B. opalinus* e *B. cephalus* na espécie de *B. insignis*, todos os locos demonstraram-se polimórficos

Apesar de vários benefícios, os marcadores microssatélites também apresentam algumas desvantagens. Não existe um modelo evolutivo universal que compare as diferenças genéticas das populações. Podem ocorrer não ampliações na PCR por serem mutações como anelamento, substituições, deleções, inserções, os quais são chamados de alelos nulos. Existem casos de superestimativa de homozigotos, competição entre alelos. Alguns alelos são isolados pela primeira vez e pode não ocorrer anelamento com espécies relacionadas, por haver porções não codificantes (Sanches & Galetti Jr, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da grande diversidade de espécies de peixes e da sua grande importância econômica para o homem, ainda pouco se conhece sobre suas características biológicas, ecológicas e genéticas. Embora este trabalho tenha analisado também indivíduos na região do pantanal, os resultados encontrados assemelham-se a estudos anteriores realizados apenas no rio Cuiabá, tornando necessários estudos e análises de outras populações objetivando detectar algum marcador cromossômico que as caracterizem.

Atualmente tem se discutido com mais frequência a conservação de recursos genéticos de peixes. Frente a enorme diversidade de espécies encontradas no Brasil pouco ainda se conhece sobre a estrutura genético-populacional desses recursos. O declínio da diversidade biológica aquática não deve ser preocupante somente pela queda do número de indivíduos de uma espécie, mas primeiramente pela perda de sua variabilidade populacional (Hilsdorf, 1997).

Vários marcadores de análise do DNA baseados na PCR foram desenvolvidos, permitindo que a avaliação genética de um animal, de uma comunidade ou de uma população seja determinada com maior precisão, antes mesmo da expressão do seu fenótipo, e desta forma, fornecer uma metodologia mais objetiva para a pesquisa e

monitoramento genético em estoques mantidos em cativeiro e em populações naturais (Lopera-Barrero, 2007).

CONCLUSÕES

- O número de cromossomos em *Brycon microlepis* é de 50 cromossomos, sendo 20 metacêntricos, 24 submetacêntricos e 06 subtelo-cêntricos;
- Sítios de Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs) conservados em um par cromossômico comum;
- Bandas de marcações da heterocromatina constitutiva (bandamento C) pericentroméricas em ambos os braços cromossômicos do primeiro par de cromossomos metacêntricos e nas regiões centroméricas da maioria dos outros cromossomos;
- Os *primers* BoM7 e BoM12 tiveram melhores resultados na amplificação, formaram bandas fracas.
- A criação de um banco de DNA de *Brycon microlepis* depositado no laboratório de Citogenética animal da UFMT, coletados de 2010 a 2014, compreendendo o rio Paraguai e rio Cuiabá, nas cidades de Cuiabá, Barão de Melgaço, Santo Antônio de Leverger, Barra do Bugres e Cáceres, no Mato Grosso é importante para a realização de estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALJANABI, S.M. & MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, v.25, p. 4692-4693, 1997.
- ALMEIDA-TOLEDO, L.F., BIGONI, A.P., BERNARDINO, G., FORESTI, F. AND TOLEDO-FILHO, S.A. Karyotype and NOR conservatism with heterochromatin reorganization in Neotropical Bryconids. *Caryologia*, v.49, p. 35-43, 1996.
- ANTUNES, RSP; GOMES, VN; PRIOLI, SMAP; PRIOLI, RA; JULIO JR., HF; PRIOLI, LM; AGOSTINHO, CS; PRIOLI, AJ. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.9, n.2, p.674-684, 2010.
- BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; MELLO, A.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae). *Molecular Ecology Notes*, v.3, p.297–298, 2003.
- BERT PF, JOUAN I, DE LABROUHE DT, SERRE F, NICOLAS P, VEAR F. *Theoretical and Applied Genetics*. 105(6-7), 985-993. 2002.

BRITSKI, H.A., SILIMON, K.Z.S., LOPES, B.S. Manual de identificação de peixes do Pantanal Mato-grossense. SPI. EMBRAPA – Corumbá – MS. 184p., 1999.

BRITSKI H.A., SILIMON K.Z.S. & LOPES B.S. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2007.

DANIEL-SILVA, M.F.Z. *Análises citogenéticas comparativas em Characidae (Pisces, Characiformes)*. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil., 2001.

ESCHMEYER, W.; FRICKE, R., FONG, J.D., POLACK, D.A. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). *Zootaxa* 2525: p.19-50 2010.

FORESTI, F; ALMEIDA-TOLEDO, LF; TOLEDO-FILHO, SA. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet Cell Genet*, v. 31, p.137-144, 1981.

HILSDORF, A.W.S.; Biologia Molecular:Uma realidade para a aquicultura. *Panorama da Aquicultura*, Janeiro/fevereiro p.10-12, 1997.

HILSDORF, A.W.S.; MARQUES, D.K.S.; RESENDE, E.K. *Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas*. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 43p. (Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973; 82), 2006.

HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1- step method. *Experientia*, v.36, p.1014 – 1015, 1980.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, v.43, p.1-47, 1982.

LEVAN, A., FREDGA, K. & SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v. 52, p.201 – 220, 1964.

LOPERA-BARRERO, N.M. Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2007.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A. O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar? *Aqüicultura & Pesca*, v30, p. 71-74, 2007.

LOPEZ, D. D.; PALACIO, G. V.; CORTES, T. R.; ANGEL, M. O. Caracterización citogenética Del pez neotropical *Brycon henni* (Pisces, Characidae). *Rev. Biol. Trop.*, vol. 56, n.4, p.1619-1628, 2008.

MARGARIDO, V.P. & GALETTI JR., P.M. Chromosome studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios*, v.85, p.219-228, 1996.

MARIGUELA, T. C.; NIRCHIO, M.; RON, E.; GAVIRIA, J. I.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic characterization of *Brycon amazonicus* (Spix et Agassiz, 1829) (Teleostei:

Characidae) from Caicara Del Orinoco, Venezuela. *Comparative Cytogenetics*, vol. 4, n. 4, pp. 185-193, 2010.

MATSUMOTO, C.K. & HILSDORF, A.W.S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology*, v.7, n.3, p.395-402, 2009.

NELSON, J.S. Fishes of the world. 3Rd. edition. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. 1994.

PAES, A.D.N.V.A. *Caracterização citogenética das espécies matrinxã (Brycon amazonicus), piraputanga (Brycon hilarii) e sua geração filial, utilizados na piscicultura brasileira*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Campus de Botucatu, 97p., 2011.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; JAYME APARECIDO POVH, J.A.; VARGAS, L.; SIROL, R.N.; JACOMETO, C.B. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. *Pesq. agropec. bras.*, v.45, n.1, p.56-63, 2010.

ROSSINI, B.C.; NUNES, A.G.; FREITAS, P.D.; GALETTI Jr, P.M. Isolation and characterization of microsatellite loci of the freshwater fish *Salminus franciscanus*. *Molecular Ecology Resources*. 2010.

RYDER, O.A.; McLAREN, A; BRENNER, S.; YA-PING, Z. & BENIRSCHKE, K. DNA banks for endangered animal species. *Science* 288: 275-277, 2000.

SANCHES, A. & GALETTI JR., P.M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*. 2006.

SANCHES, A. *Estrutura genética populacional de Brycon hillarii, (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda e seu significado para programas de conservação*. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007.

SANCHES, A.; GALETTI Jr., P.M.; GALZERANI, F.; DERAZO, J.; CUTILAK-BIANCHI, B.; HATANAKA, T.; Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research*. p.177-186, 2012.

SILVA, S.A.; PENTEADO, P.R.; PAZZA, R.; KAVALCO, K.F. Avaliação da transferibilidade de locus de microsatélites em oito species de *Astyanax*. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*. v2. n°1, 2011.

SUMNER, A.T. . A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, v.75, p.304-6, 1972.