

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA

Programa de Pós-Graduação “*Stricto Sensu*” em Ciências
Genômicas e Biotecnologia

MESTRADO

**Isolamento e Caracterização de Locos de Microssatélite
para *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes,
Aves).**

Autora: Camila Louly Corrêa

Orientadora: Dra. Rosane Garcia Collevatti

Co-Orientador: Dr. Renato Caparroz

**BRASÍLIA
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Camila Louly Corrêa

**Isolamento e Caracterização de Locos de Microssatélite
para *Neothraupis fasciata*, (Emberizidae, Passeriformes,
Aves).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília como Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rosane Garcia Collevatti
Co-Orientador: Dr. Renato Caparroz

Brasília
2009

Agradecimentos

A Deus pela sua presença em minha vida.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Edna, meu pai Celso e meus irmãos Gustavo e Felipe, pelo incentivo, apoio, motivação em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Saulo que sempre esteve presente na minha vida e sempre me deu força para correr atrás dos meus sonhos e objetivos.

A minha orientadora Rosane Garcia Collevatti pela disposição e atenção nos momentos que precisei e pela contribuição em minha formação profissional.

Ao meu co-orientador Renato Caparroz pela dedicação no meu trabalho e pela contribuição em minha formação profissional.

Aos demais professores e funcionários que integram o Curso de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB.

Aos amigos que estiveram presente durante todo o curso, me ajudaram no laboratório, foram companheiros e me incentivaram em todos os momentos que precisei. Meus sinceros agradecimentos a Gláu, Su, Ciro e Gi.

Aos colegas de bancada que estiveram presente durante o meu trabalho me ajudando sempre que eu precisei: Aline, Luciana e Milena.

Aos amigos de coleta Wallace e Felipe pela ajuda nas coletas de sangue e dedicação ao trabalho de campo.

Ao Msc. Alan Fecchio e o Dr Miguel A. Marini que me concederam as amostras de sangue utilizadas no trabalho.

Resumo

Os microssatélites são pequenas sequências repetidas em *tanden* composta de um a seis nucleotídeos. Os locos de microssatélite apresentam elevadas taxas de mutação o que os tornam potencialmente polimórficos. São amplamente utilizados nas áreas de genética da conservação e genética de populações, assim como na investigação forense, no diagnóstico de doenças, em estudos ecológicos e na análise de parentesco. A cigarra-do-campo (*Neothraupis fasciata*) é endêmica do Cerrado e ocorre em áreas com pouca interferência antrópica. Tais características tornam esta espécie um modelo biológico ideal para avaliar os possíveis efeitos da fragmentação do Cerrado sobre a diversidade genética de aves. Além disso, esta espécie apresenta sistema de reprodução cooperativo. A utilização de microssatélites será importante para avaliar a influência da fragmentação sobre a estrutura genética dessa espécie e também para análise de parentesco visando estudo do comportamento reprodutivo. Foram isolados e caracterizados locos microssatélites, e os pares de iniciadores também foram testados quanto à amplificação cruzada em oito espécies de aves neotropicais: *Sicalis flaveola*, *Ammodramus humeralis* (Emberizidae), *Thraupis sayaca*, *Gypsnagra hirundinaceae*, *Paroaria capitata*, *Ramphocelus carbo* (Thraupidae), *Casiornis rufus* (Tyrannidae) e *Xiphorhynchus picus* (Dendrocolaptidae). Os locos microssatélites foram desenvolvidos a partir de biblioteca genômica *shotgun*, construída com a utilização do vetor plasmidial *pCR[®]4Blunt-TOPO* com auxílio do *TOPO Shotgun Subcloning Kit*. Os insertos purificados foram sequenciados utilizando os iniciadores T3 e T7 e o kit *DYEnamic ET Terminator*. As amostras foram analisadas em um sequenciador automático (MegaBACE 500). O programa Staden 1.6 foi utilizado para analisar as sequências e isolar os fragmentos contendo microssatélites. Foram sequenciados 928 clones, a partir dos quais foram identificados 278 *contigs* ou insertos. Desses, 51 (18%) continham locos de microssatélite sendo: 27 di, 17 tri, quatro tetra e três pentanucleotídeos. Pares de iniciadores foram desenhados para 17 locos de contendo microssatélites perfeitos. Esses locos foram caracterizados com base em 24 indivíduos de uma população de *N. fasciata* da Estação Ecológica de Águas Emendadas, no município de Planaltina, no Distrito Federal. A genotipagem foi feita em gel desnaturante de poliacrilamida 5% no ABI 377 e as análises foram feitas com o auxílio dos programas GeneScan e Genotyper 2.1. Os locos microssatélites apresentaram média de 5,3 alelos por loco (variando de 2 a 18), heterozigosidade observada variando de 0,083 a 1,0 ($H_o = 0,394$, média para todos os locos) e heterozigosidade esperada variando de 0,117 a 0,915 ($H_e = 0,540$, média para todos os locos). O conjunto de locos desenvolvidos apresentou alto valor de exclusão de paternidade (0,999) e baixa probabilidade de identidade genética (1.72×10^{-10}), tornando-o com potencial grande de utilização para a análise da estrutura genética e de parentesco. Dentre os 16 pares de iniciadores sintetizados, 11 pares amplificaram em *S. flaveola*, *T. sayaca*, *G. hirundinaceae*, *P. capitata* e *R. carbo*. O sucesso na amplificação cruzada poderá ser útil para o estudo de Passeriformes, principalmente para espécies das famílias Emberizidae e Thraupidae.

Palavras-chave: Microssatélite, *Neothraupis fasciata*, Cerrado, Emberizidae, amplificação heteróloga, Thraupidae.

Abstract

Microsatellite molecular markers are small repeated sequences in tandem compound of 1 to 6 nucleotides. Widely used as genetic markers, the microsatellites have a particular attribute that is the high rates of mutation. These molecular markers are widely used in conservation genetics, population genetics, forensic research, diagnosis of diseases, ecological studies and analysis of paternity. This range of applications are explained by the fact that microsatellites are co-dominant and multi-allelic, are highly reproducible, have high resolution and are based on polymerase chain reaction (PCR). *Neothraupis fasciata* is endemic of the Cerrado and occurs in areas with little human interference. These characteristics make this specie an ideal biological model to assess the possible effects on Cerrado's fragmentation above the birds genetic diversity. Furthermore, this specie presents cooperative breeding system. The use of microsatellite molecular marker types will be important for kinship analysis to obtain new results on reproductive behavior of the species studied and understand the population's genetic structure. On this study were developed and characterized microsatellites loci that were tested in eight other birds species. The microsatellites loci were developed from non-enriched genomic library. The library was constructed using the plasmid vector *pCR[®]4Blunt-TOPO* using the TOP Shotgun Subcloning Kit. The purified inserts were sequenced using the T3 and T7 primers and the ET Terminator kit *DYEnamic*. The samples were analyzed in an automatic sequencer (MegaBACE 500). 928 clones were sequenced with a total of 278 inserts, of which 51 (18%) contained microsatellites loci, which are: 27 di, 17 tri, four tetra and three pentanucleotídeos. 17 primer pairs were designed and amplifications of sixteen these primer pairs had a clear interpretation in temperature ranging from 52 to 56 ° C and were characterized using 24 individuals of a population of *N. fasciata*. The microsatellite loci showed an average of 5.3 alleles per locus (ranging from 2 to 18), observed heterozygosity ranging from 0.083 to 1.0 ($H_o = 0.394$, mean for all loci) and expected heterozygosity ranging from 0.117 to 0.915 ($H_e = 0.540$, mean for all loci). The loci had developed a high value of excluding paternity (0.999) and low probability of genetic identity (1.72×10^{-10}) which makes it possible to use these loci on kinship analysis and species genetic structure. The transferability was tested in *Sicalis flaveola*, *Ammodramus humeralis* (Emberizidae), *Thraupis sayaca*, *Gypsnagra hirundinaceae*, *Paroaria capitata*, *Ramphocelus carbo* (Thraupidae), *Casiornis rufus* (Tyrannidae) and *Xiphorhynchus picus* (Dendrocolaptidae). Among the 16 synthesized primer pairs, 11 pairs amplified in *S. flaveola*, *T. sayaca*, *G. hirundinaceae*, *P. capitata* and *R. carbo*. The success of amplification may be useful on Passeriformes studies, especially for the family Emberizidae and Thraupidae species.

Keywords: Microsatellite, *Neothraupis fasciata*, Cerrado, Emberizidae, cross-species amplification, Thraupidae.

Índice de Figuras

Figura 1: Crossing over desigual entre cromossomos homólogos. (Oliveira et al., 2006). ---	09
Figura 2: Slippage durante a replicação do DNA. (Oliveira et al., 2006).-----	09
Figura 3: Modelo de deslizamento da DNA polimerase conhecido por “Stutter”-----	13
Figura 4: Eletroferograma indicando o alelo principal e presença de Stutter-----	13
Figura 5: Foto ilustrativa da Cigarra do Campo (<i>Neothraupis fasciata</i>).-----	15
Figura 6: Método Shotgun. (Manual do Kit Topo Shotgun). -----	20
Figura 7: Nebulizador do Kit Shotgun. (Manual do Kit Topo Shotgun). -----	21
Figura 8: Vetor do Kit Shotgun. (Manual do Kit Topo Shotgun). -----	23
Figura 9: Foto ilustrativa do sequenciador MegaBACE. (WWW.ncl.ac.uk/.../flx/sequencingview.htm). -----	25
Figura 10: Programa para desenho dos iniciadores. -----	27
Figura 11: Amplificação via PCR do lisado de bactérias da Placa 1. -----	30
Figura 12: PCR do Primer NF2324 (360bp). -----	30
Figura 13: Fluxograma das etapas do desenvolvimento dos microssatélites para o desenho dos iniciadores. -----	31
Figura 14: Tipos de microssatélites. -----	33
Figura 15: Gel Desnaturante Poliacrilamida 4%. -----	35

Índice de Tabelas

Tabela 1: Lista dos 51 locos de microssatélites isolados em <i>N. fasciata</i> , número de repetições dos motivos, os locos em negritos e sublinhados foram selecionados para o desenho dos iniciadores. -----	32
Tabela 2: Tipos de microssatélites encontrados para <i>Neothraupis fasciata</i> , sequências dos iniciadores e temperatura de anelamento de cada iniciador. -----	34
Tabela 3: Caracterização dos 17 locos de microssatélites de <i>N. fasciata</i> , baseado em uma amostra de 24 indivíduos. -----	36
Tabela 4: Amplificação cruzada de 16 locos de microssatélites desenvolvidos para <i>N. fasciata</i> para oito espécies da mesma família e famílias diferentes. -----	37

Sumário

1	Introdução -----	8
1.1	Microssatélites -----	8
1.2	A espécie alvo: <i>Neothraupis fasciata</i> -----	14
1.3	Distribuição Geográfica da espécie: O cerrado -----	16
2	Objetivos -----	18
2.1	Objetivo Geral -----	18
2.2	Objetivos específicos -----	18
3	Material e Métodos -----	19
3.1	Extração do DNA genômico de <i>Neothraupis fasciata</i> -----	19
3.2	Construção da Biblioteca Genômica -----	20
3.3	Lise das Bactérias -----	23
3.4	PCR do Lisado de Bactérias -----	23
3.5	Purificação dos Produtos de PCR com PEG -----	24
3.6	Sequenciamento das Amostras -----	24
3.7	Análise das Sequências -----	26
3.8	Amplificação dos iniciadores desenvolvidos -----	27
3.9	Seleção dos locos polimórficos -----	28
3.10	Caracterização dos locos polimórficos -----	28
3.11	Análises de amplificação cruzada-----	28
4	Resultados -----	30
4.1	Construção da Biblioteca Genômica -----	30
4.2	Isolamento de microssatélite, desenho dos iniciadores e otimização -----	31
4.3	Seleção dos locos polimórficos -----	34
4.4	Caracterização dos locos polimórficos -----	35
4.5	Amplificação cruzada dos iniciadores de <i>N. fasciata</i> -----	37
5	Discussão -----	38
6	Conclusões -----	43
7	Referências Bibliográficas -----	44
8	Anexo A: Resumo de participação em congresso -----	49
9	Anexo B: Artigo submetido na <i>Journal of Heredity</i> -----	51

1- Introdução

1.1 Microssatélites

Microssatélites, também conhecidos por sequências simples repetitivas (SSR), são regiões repetitivas de DNA, composta de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* que se encontram tanto em genomas de procariotos quanto de eucariotos (Tóth et al., 2000). Amplamente utilizados como marcadores genéticos, microssatélites apresentam um atributo especial na medida em que apresentam elevadas taxas de mutação (10^{-3} a 10^{-6}) quando comparadas com regiões codificantes do genoma (10^{-9} a 10^{-10}) (Jarne & Lagoda, 1996; Hoelzel, 1998).

Os microssatélites são classificados de acordo com a sequência repetitiva em: perfeito, imperfeito ou composto. No microssatélite perfeito, a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertencem ao motivo (por exemplo, TATATATATA), enquanto que em um imperfeito há uma ou mais bases entre as sequências repetidas (por exemplo, TATATACTATATA). Enquanto um microssatélite composto, a sequência contém dois ou mais motivos diferentes adjacentes (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGT) (Weber, 1990).

Os locos microssatélite evoluem por meio de processos mutacionais decorrentes dos escorregões da DNA polimerase (slippage) (Figura 1) ou recombinação (*crossing over*) desigual (Figura 2) (Strand et al., 1993).

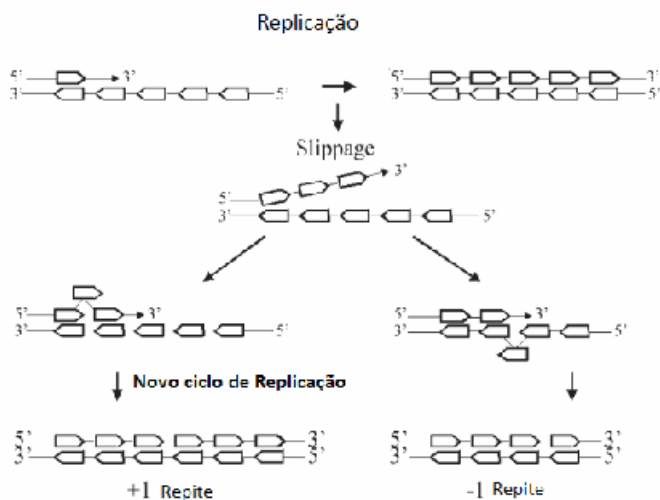


Figura 1. *Slippage* durante a replicação do DNA. Adaptado de Oliveira et al., 2006.

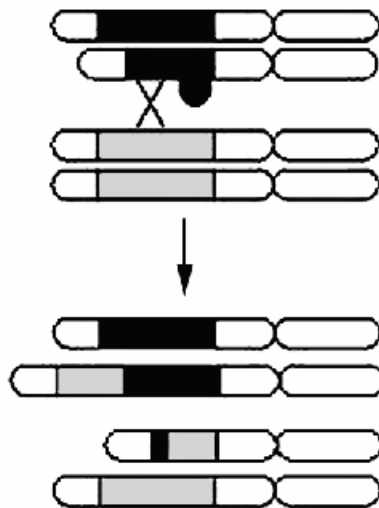


Figura 2. *Crossing over* desigual entre cromossomos homólogos. Fonte: Oliveira et al., 2006.

Em relação à inclusão de erros durante a recombinação, Levinson e Gutman (1987) verificaram que cepas de *Escherichia coli*, com ou sem sistema de recombinação funcional apresentaram taxa de mutação semelhante, sugerindo que a recombinação não é o mecanismo predominante na geração de variabilidade de microssatélites. Quando ocorre *crossing over* desigual podem ocorrer mudanças drásticas, como perda ou ganho de um grande número de

unidades de repetição. Isto porque quando regiões repetitivas estão presentes, um grampo pode ser formado durante a sinapse, o que significa que apenas uma parte, geralmente desigual em comprimento, de cada cromossomo será trocada, um cromossomo receberá um fragmento maior devido ao maior número de regiões repetitivas trocadas, e o outro cromossomo receberá um número menor (Oliveira et al., 2006).

Os microssatélites não são distribuídos regularmente dentro de um único genoma devido às diferenças nas suas frequências dentro de regiões codificantes e não codificantes e os possíveis papéis funcionais das diferentes repetições (Wilder & Hollocher, 2001). A frequência de microssatélites também varia por táxon, em termos de números absolutos de locos microssatélites e número de repetições preferenciais (Hancock, 1999). Devido à elevada taxa de mutação em regiões de microssatélites é de se esperar que regiões codificantes tenham uma baixa densidade de microssatélites devido à perda de funcionalidade. Estudos comparativos (Tóth et al., 2000) em ambas regiões (codificantes e não codificantes) de diferentes espécies têm confirmado essa hipótese, mostrando que apenas tri e hexanucleotídeos encontram-se em um número excessivo em regiões codificantes. Em contrapartida, outros tipos de repetições foram menos frequentes em regiões codificantes do que em regiões não codificantes. Isto significa que a seleção contra mutações que alteram o quadro de leitura de um gene restringe a presença de microssatélites em regiões codificantes, enquanto que microssatélites com motivos múltiplos de três desenvolvem uniformemente em ambas as regiões (Metzgar et al., 2000).

Os marcadores do tipo microssatélite podem ter tanto um efeito neutro sobre o fenótipo ou podem exercer funções importantes em espécies particulares. Por exemplo, a doença de Huntington é causada por aumentos no comprimento de um motivo CAG no gene da proteína huntingtina no cromossomo quatro humano (Moxon & Wills, 1999). Um número cada vez maior de doenças neurodegenerativas tem sido relacionado à expansão de unidades de repetição de microssatélites. Alguns estudos indicam que os microssatélites estão

associados com a regulação e/ou funcionamento dos genes, por exemplo, o motivo (TC)_n na região 5' UTR em *Arabidopsis* de certos genes desempenham um papel no sentido anti-transcrição (Kashi & Soller, 1999). Microssatélites são conhecidos por estarem relacionados com a patogenicidade e variabilidade genômica em muitos microorganismos e muitos exemplos mostram que os microssatélites estão associados à modulação da expressão gênica microbiana (Field and Wills, 1998; Saunders et al., 1998). Em eucariotos há fortes indícios que os microssatélites atuam na regulação da expressão gênica visto que esses marcadores são encontrados em regiões promotoras (Biggin & Tjian, 1988; Gilmour et al., 1989).

Marcadores moleculares do tipo microssatélite tem sido um dos mais aplicados em estudos genéticos com possibilidades de uso em diversos campos da genética incluindo, genética da conservação, genética de populações e genética forense. De acordo com Heywood e Iriando (2003), microssatélites fornecem informações relevantes para a identificação de unidades de conservação e para investigar os processos genéticos que ocorrem em populações, como padrões de fluxo gênico e incidência da deriva genética. Esta gama de aplicações explica-se pelo fato dos microssatélites serem potencialmente co-dominantes, multi-alélicos e por serem baseados na reação em cadeia polimerase (PCR). Collevatti e colaboradores (2001) mostraram que o elevado polimorfismo de marcadores do tipo microssatélite fornece uma extraordinária resolução para discriminar eventos de autopolinização, e até mesmo cruzamento entre indivíduos aparentados. Atualmente, novos e eficientes métodos de isolamento de seqüências repetitivas foram desenvolvidos, o que levou a uma diminuição de custos e esta tecnologia têm sido cada vez mais aplicada para várias espécies, incluindo organismos não-modelos (Oliveira et al., 2006).

Um atributo que vem sendo utilizado é conhecido por transferibilidade, onde iniciadores desenvolvidos para uma espécie podem ser utilizados para outras espécies do

mesmo gênero, ou mesmo para diferentes gêneros da mesma família (Cipriani et al., 1999). A transferibilidade pode ser um fator muito importante no sentido de facilitar a utilização de microssatélites, pois reduz os custos e o tempo do trabalho. A transferibilidade entre espécies afins ocorre devido à natureza homóloga do DNA das regiões que flanqueiam os locos de microssatélite. No entanto, como esperado, o sucesso de amplificação declina quando a divergência genética aumenta entre as espécies (Primmer & Merilä, 2002).

Existem artefatos da técnica de PCR que podem interferir na interpretação e genotipagem dos alelos de uma população onde indivíduos denominados homozigotos podem ser na verdade heterozigotos. Qualquer alelo em um determinado loco que falha consistentemente na amplificação via PCR devido a mutações, inserções ou deleções é conhecido por alelo nulo. Qualquer mutação que está dentro da sequência flanqueadora do iniciador pode inibir ou impedir completamente a ligação, resultando numa reduzida ou completa perda do produto (Callen et al., 1993). A ocorrência de alelos nulos é um problema em estudos populacionais, principalmente em estudos de parentesco (Bowling et al., 1997), visto que a presença dos mesmos pode levar a exclusão de parentesco onde na verdade seria inclusão.

Outro artefato da técnica de PCR é a formação de produtos conhecidos como “stutter” (Figura 3). Este produto difere no tamanho do alelo principal por múltiplos da unidade de repetição, produzindo fragmentos que apresentam uma ou mais unidades repetitivas a menos do que o alelo verdadeiro. Os “stutters” são produzidos por deslizamentos da DNA polimerase durante o processo de amplificação (Figura 4). Motivos do tipo dinucleotídeo são os mais frequentes na ocorrência de “stutters” (Walsh et al., 1996).

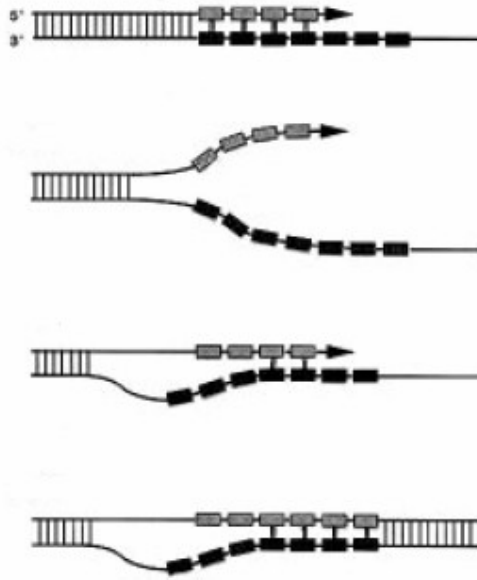


Figura 3: Modelo de deslizamento da DNA polimerase conhecido por *stutter*. Fonte: Adaptado de Walsh et al., 1996.

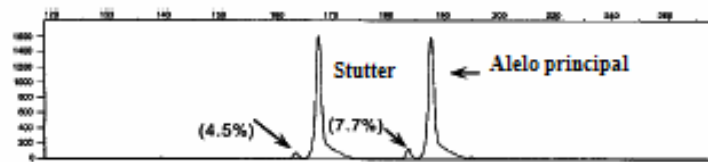


Figura 4: Eletroferograma indicando o alelo principal e a presença de *stutter*. Fonte: Adaptado de Walsh et al., 1996.

Outro artefato que pode levar a um erro de interpretação na genotipagem é a amplificação preferencial de alelos menores, evento denominado “short allele dominance” (Wattier et al., 1998), ou também conhecido por fuga de alelos (allele dropout). Wattier e colaboradores (1998) compararam dois métodos de amplificação para detectar a deficiência aparente de heterozigotos como consequência da amplificação preferencial de alelos curtos devido à natureza competitiva da amplificação via PCR. Com isso em indivíduos heterozigotos, somente o alelo menor é detectado e ele é considerado homozigoto

incorretamente. Isto pode levar a uma estimativa errônea de déficit de heterozigotos na população, afetando, por exemplo, estimativas de parentesco (Marshall et al., 1998). Devido à presença desses artefatos fica evidente a importância do desenvolvimento de métodos estatísticos para detectar e discriminar os diferentes tipos de erros de genotipagem em estudos populacionais.

As vantagens encontradas nessa classe de marcadores microsatélites são: *i*) comportamento codominante, podendo-se distinguir os indivíduos heterozigotos em uma população; *ii*) potencial grau de polimorfismo por loco gênico; *iii*) distribuição aleatória por todo o genoma podendo estar associado a regiões expressas (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Pérez et al., 2005); *iv*) alta conservação entre espécies relacionadas, que tem permitido a transferências destes marcadores entre espécies utilizando iniciadores heterólogos (Xu et al., 1999). As maiores limitações quanto à utilização de tais marcadores estão relacionadas aos custos para o seu desenvolvimento. Para a obtenção de iniciadores adequados, são necessários passos de caracterização de diferentes “motivos” que se repetem ao longo do genoma, construção de bibliotecas, sequenciamento do DNA e triagem dos iniciadores construídos, visando identificar locos mais informativos. O conhecimento sobre biologia molecular, a disponibilidade de equipamentos e suplementos sofisticados são também limitantes para desenvolvimento destes marcadores (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

1.2 A Espécie Alvo: *Neothraupis fasciata*

A cigarra-do-campo (*Neothraupis fasciata*, Thraupinae, Passeriformes: Aves) (Figura 5) com cerca de 15cm de comprimento, apresenta o lado superior cinzento, máscara e coberteiras superiores das asas negras, sendo que nestas últimas há uma faixa branca. A garganta e abdômen são igualmente brancos, o peito é cinzento e os olhos e pés escuros (Sick, 1997). A cigarra-do-campo é uma espécie endêmica do Cerrado ocorrendo desde o Maranhão

a São Paulo e Mato Grosso do Sul, até Santa Cruz, no leste da Bolívia (Pinto, 1944). Esta espécie habita principalmente as fitofisionomias abertas do Cerrado (campo sujo e cerrado *sensu stricto*) e capões (Sick, 1997).



Figura 5: Foto da cigarra-do-campo (*Neothraupis fasciata*).

Até recentemente, sua biologia permanecia praticamente desconhecida. Estudos de sua participação em bandos mistos de aves e do seu comportamento social foram feitos por Silva (1980) e Alves (1988). Silva (1980) mostrou que *N. fasciata* participa de bandos mistos de espécies ou atua como espécie central, ajudando a manter estes bandos por meio de movimentos e vocalização. A reprodução de *N. fasciata* em área de cerrado do Brasil Central ocorre na estação chuvosa, de setembro a janeiro (Alves & Cavalcanti, 1990). Os casais aparentemente são monogâmicos e geralmente constroem seus ninhos a menos de um metro do solo em área de cerrado nativo. A postura usual é de dois a três ovos brancos com manchas avermelhadas (Alves & Cavalcanti, 1990).

Apenas a fêmea constrói o ninho e os machos ajudam os jovens na alimentação. É comum a presença de “helpers”, ou seja, indivíduos normalmente do sexo masculino que permanecem próximos aos ninhos ajudando na alimentação e na defesa territorial (Alves,

1990). A relação dos “helpers” com o casal reprodutor não é conhecida, entretanto, estudos demonstraram que indivíduos marcados quando filhotes foram encontrados com seus pais até a estação reprodutiva seguinte. Este fato do comportamento social poderá ser elucidado com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélite para determinar o grau de parentesco entre os “helpers” e casal reprodutor.

1.3 Distribuição Geográfica da Espécie: Cerrado

O Cerrado, ou domínio morfoclimático dos Cerrados (Ab'Saber, 1977), é a maior, mais rica e provavelmente mais ameaçada região de savanas do mundo (Silva & Bates, 2002). A avifauna do bioma Cerrado corresponde a aproximadamente 50% das espécies brasileiras (Silva, 1995; Primack & Rodrigues, 2001), ou seja, em torno de 837 espécies distribuídas em 64 famílias sendo que, 3,8% são endêmicas, 9,3% migratórias e 23% ameaçadas de extinção (Silva, 1995; IBAMA 2003; Moura et al., 2005). Apesar da diversidade e da presença de espécies endêmicas, não apenas da ornitofauna como de outros animais e plantas, o Cerrado é um dos ambientes sob intenso impacto antropogênico sendo considerado um “hot spot” de biodiversidade (Myers et al., 2000). Apesar de o Cerrado ocupar um quarto da extensão territorial do País, apenas 1,2% de sua extensão constitui unidades de conservação (Cavalcanti, 1999; Lima, 2003).

A destruição dos ambientes naturais pela ocupação humana é considerada a maior ameaça mundial para a biodiversidade (Saunders et al., 1991; Bierregaard Jr. et al., 1992). Apesar de a ocupação humana ocorrer de diferentes maneiras e intensidades, invariavelmente há a substituição de ambientes naturais complexos por outros antropogênicos mais simplificados (ex: áreas de agricultura) e em muitos casos esse processo é irreversível. Como consequência, as populações das espécies ficam confinadas aos fragmentos criados, aumentando o risco de ocorrerem extinções locais (Simberloff, 1994). Além da diminuição da

área disponível para a maioria das espécies, as manchas de vegetação nativa em que persistem passam a sofrer alterações secundárias que levam à modificação da qualidade dos habitats remanescentes (Saunders et al. 1991). Tais alterações podem ser tão profundas que algumas populações desaparecem antes mesmo da observação de problemas de consangüinidade resultantes do confinamento a um determinado fragmento (Mills & Smouse, 1994).

Até o presente momento, poucos trabalhos investigaram os efeitos da fragmentação de hábitat sobre a avifauna do Cerrado. Estes abordaram principalmente alterações de parâmetros relativos à estrutura e composição das taxocenoses, tais como abundância e riqueza de espécies nos fragmentos (e.g. Machado, 2000; Marini, 2001; Tubelis *et al.*, 2004). Aparentemente, existem apenas dois estudos sobre efeitos da fragmentação na diversidade genética de populações de aves (Ferreira, 2001; Roma, 2006). Estudos abordando a estrutura genética das aves neotropicais são limitados e pouco é conhecido sobre a diversidade genética perdidas pelos efeitos da fragmentação dos habitats (Bates, 2000; McDonald, 2003; Francisco et al., 2009).

2- Objetivos

2.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar marcadores moleculares do tipo microssatélite para *Neothraupis fasciata* a fim de disponibilizar ferramentas para análise da estrutura genética e das relações de parentesco nessa espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar locos de microssatélite a partir de biblioteca genômica *shotgun* para *Neothraupis fasciata*;
- Desenvolver pares de iniciadores para amplificação via PCR dos locos identificados que apresentam características favoráveis para estudos genéticos e
- Avaliar a utilização de pares de iniciadores desenvolvidos para *N. fasciata* na amplificação de locos microssatélite em outras espécies de aves neotropicais.

3- Material e Métodos

3.1 Extração do DNA genômico de *Neothraupis fasciata*

As amostras de sangue de *N. fasciata* utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Prof. Dr Miguel A. Marini e pelo Msc. Alan Fecchio e coletadas na Estação Ecológica de Águas Emendadas (15°34'S, 47°42'W), Planaltina, Distrito Federal. A extração de DNA foi feita a partir do protocolo de digestão com proteinase K/SDS e purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, segundo descrito por Bruford et al. (1992), com modificações. Uma gota de sangue foi incubada em 370µl de tampão de extração (1xTNE, 1M Tris HCL pH 7,5, 10% SDS, 0,5ng Proteinase K) à 56° C por um período de aproximadamente 16 horas (*overnight*). Em seguida, foram adicionados 350 µl de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), misturando-se o conteúdo até uma aparência leitosa, iniciando nesta fase, a degradação do material protéico. A suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro *eppendorf*. Posteriormente, foi adicionado 2 a 3 volumes de etanol absoluto, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 7 minutos. Em seguida, foi feita lavagem com 300µl de etanol 70%, centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. A secagem do DNA foi feita no *speed-vacuum* (Eppendorf Concentrator 5301) por aproximadamente 15 minutos e em seguida, o DNA foi ressuspendido em 50µl de tampão TE (10mM Tris-HCL, pH 8,0 e 1 mM EDTA). O DNA purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (5 V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml) e quantificado visualmente por comparação com o marcador padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Para finalizar, as amostras de DNA foram diluídas em água Milli-Q estéril para uma concentração final de aproximadamente 20 ng/µl.

3.2 Construção da Biblioteca Genômica

A biblioteca genômica foi construída a partir de uma amostra de DNA de uma fêmea de *N. fasciata* utilizando o *kit* TOPO Shotgun Subcloning (Figura 6). O DNA genômico total foi clivado por nebulização. Para a nebulização, 20µg de DNA em 100 µl de solução tampão (TE, pH 8,0 contendo 20% de glicerol) foi adicionado ao nebulizador do *kit* (Figura 7) e comprimido a 30 psi até obter fragmentos com tamanho entre 200 pb e 1 Kb. Foi utilizado eletroforese em gel de agarose 1% na presença de brometo de etídio (1 µg/ml) para verificar o tamanho dos fragmentos de DNA.

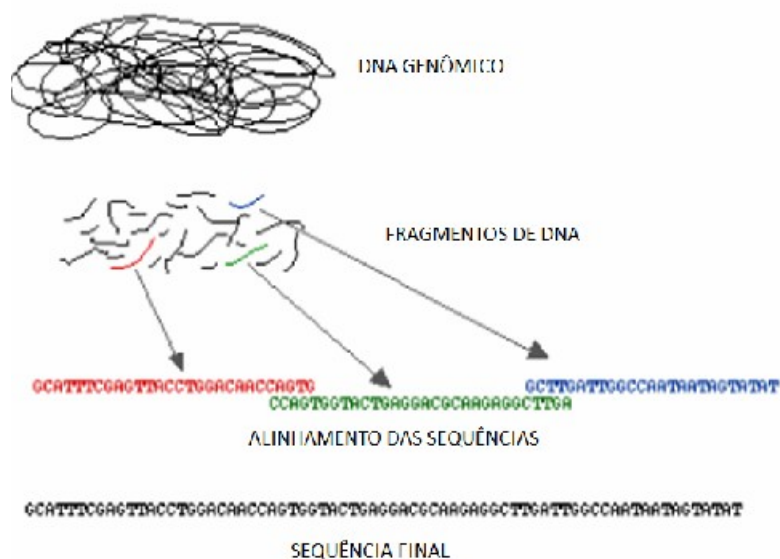


Figura 6: Método Shotgun. Adaptado de:
www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/shotgun.html

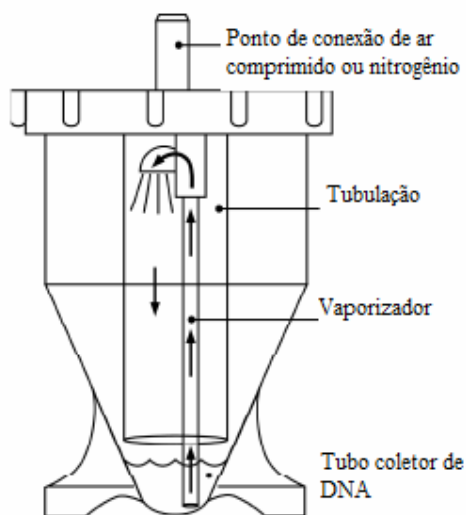


Figura 7: Nebulizador do kit *Topo Shotgun*. Adaptado do manual do kit.

O DNA clivado foi precipitado para sua recuperação para as etapas posteriores. Para a precipitação, 700µl de DNA clivado foi transferido para um *ependorf* estéril e foi adicionado 80µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,2; 4µl de glicogênio (20 mg/ml) e 700µl de isopropanol (100%). O material foi misturado e incubado em gelo por 15 minutos, em seguida foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada à 4°C e o sobrenadante foi removido. Posteriormente, o DNA foi lavado com 800µl de etanol 80% gelado e centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm, e o etanol foi então removido. A secagem do DNA foi feita no *speed-vacuum* (Eppendorf Concentrator 5301) por aproximadamente 5 minutos e em seguida, o DNA foi ressuscitado em 100µl de água estéril.

A reação de *blunt-end* foi preparada em gelo (15µl de DNA 200 ng/µl, 5µl de água deionizada, 5µl 10X Blunting Buffer, 1µl BSA 1 mg/ml, 5µl de dNTP mix concentração final 250µM, 2µl T4 DNA polimerase (4U/µl) e 2µl de Klenow DNA polimerase (4U/µl)). A reação foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos e depois incubada a 75°C por 20 minutos para inativar as enzimas. Para desfosforilar o DNA foi adicionado a reação *blunt-end*

35µl de água deionizada, 10µl de 10X Dephosphorylation buffer, e 5µl CIP (1U/µl), finalizando com um volume total de 100µl. A reação foi incubada a 37°C por 60 minutos.

O DNA foi novamente precipitado para sua recuperação. Foram adicionados ao DNA 100µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi centrifugado por 3 minutos em velocidade máxima e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo estéril. O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 300µl de etanol gelado. A solução contendo o DNA foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos e em seguida lavado com 500µl de etanol 80% gelado. O etanol foi removido e a secagem do DNA foi feita em *speed-vacuum* (Eppendorf Concentrator 5301) por aproximadamente 5 minutos. Por último o DNA foi ressuscitado em 20µl de água estéril. O DNA purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (5 V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml) e quantificado visualmente por comparação do marcador 1kb ladder (0,8 µg) e o DNA controle do Kit (Sheared Herring Sperm DNA, 2 µg).

Para a clonagem foi preparado uma reação com 4µl de DNA, 1µl de solução de iodeto de sódio (1,2mM) e 1µl de vetor (PCR 4Blunt-Topo, Invitrogen) (Figura 8) e a reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida 3µl da ligação foi adicionado a 50µl de célula competente (TOP 10 Electrocomp *E.coli*, Invitrogen), misturando vagorosamente. As células foram transferidas para uma curveta e eletroporadas a uma corrente de 2,8V. Por último as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (2µl/ml) e 10µl Xgal (2,8 mg/µl) para selecionar as colônias brancas (colônias com inserto) das colônias azuis (colônias sem inserto).

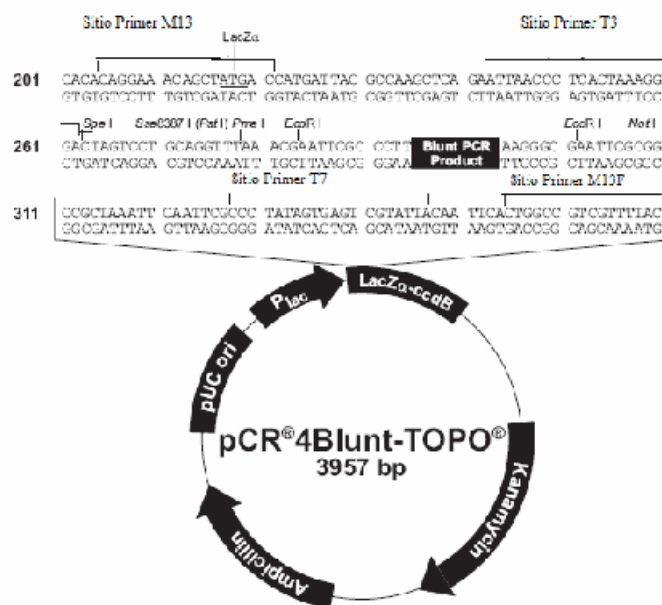


Figura 8: Vetor do *kit Topo Shotgun*. Adaptado do manual do *kit*.

3.3 Lise das Bactérias

Foi realizada lise das bactérias ao invés de utilizar o protocolo de miniprep a fim de evitar contaminação e diminuir os custos do procedimento. As colônias positivas (com inserto) foram repicadas para uma placa de PCR com 96 poços contendo 80µl de água autoclavada para lise. A placa foi submetida a uma temperatura de 95°C por 5 minutos e posteriormente 4°C por 5 minutos em um termociclador.

3.4 PCR do Lisado de Bactérias

A amplificação dos insertos foram realizadas em uma reação de volume final igual a 20µl, contendo: 1 unidade de Taq DNA polimerase, Tampão 1X para PCR (10mM Tris-HCL pH 8,3; 5mM KCL), 2mM de dNTPs, 10µM de T3, 10µM de T7 e água autoclavada para completar o volume final. O programa utilizado foi de desnaturação inicial à 94°C por 1 minuto, desnaturação do DNA à 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento do iniciador de 55°C por 1 minuto, extensão de 71°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos e conservação da reação à 10°C. Os três passos de desnaturação do DNA, anelamento e

extensão foram repetidos 30 vezes. A amplificação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% (5 V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml) e o tamanho dos fragmentos foi determinando por comparação com marcador 1kb ladder (0,8 µg).

3.5 Purificação dos Produtos de PCR com PEG

Os produtos de PCR foram purificados para retirar o excesso de iniciadores e dos dNTPs. Após a reação de PCR, foi adicionado ao volume de reação o mesmo volume de PEG e a reação incubada à 37°C por 30 minutos. Em seguida a reação foi centrifugada a 13.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionado à reação 100µl de etanol 80% gelado e mantida por 1 minuto em temperatura ambiente. Posteriormente, a reação foi centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos e sobrenadante descartado novamente. Este passo foi repetido mais uma vez para completar a lavagem do DNA. A placa contendo o DNA foi invertida na pia para a remoção do etanol e foi feito um “spin” (1 minuto) com a placa invertida a 1.000 rpm para completar a remoção do etanol. O pellet foi diluído em 15µl de água estéril. As amostras foram quantificadas em eletroforese em gel de agarose 1% na presença de brometo de etídio (1 µg/ml) e o marcador 1kb ladder (0,8µg).

3.6 Sequenciamento das amostras

Todas as amostras foram seqüenciadas utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare) (Figura 9). A reação de seqüenciamento foi preparada para um volume final de 10µl contendo 4,0µl de DNA purificado, 2,0 µM de iniciador (T3 ou T7), 2µl de pré-mix e 2µl de água destilada autoclavada. O programa utilizado para a reação de seqüenciamento foi: 95°C por 20 minutos, 55°C por 15 minutos e 60°C por 1 minuto (30 ciclos). Em seguida foi feita a purificação da reação de seqüenciamento. À reação de seqüenciamento foi adicionado 1µl de acetato de amônio (7,5M) e 25µl de etanol absoluto, a

reação permaneceu em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante então foi descartado e adicionado 100µl de etanol 70%. Uma nova centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos foi realizada e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi feito um spin com a placa invertida até atingir 1.000 rpm para completar a remoção do etanol. Por último o pellet de DNA foi ressuspensionado em 10µl de loading solution (Formamida/EDTA). As amostras correram no MegaBACE utilizando os seguintes parâmetros: 2Kv por 100 segundos e 9Kv por 100 minutos.



Figura 9: Foto ilustrativa do Sequenciador MegaBACE
Fonte: www.ncl.ac.uk/.../flx/sequencingview.htm

3.7 Análise das sequências

O programa utilizado para analisar as sequências e isolar os fragmentos contendo microssatélites foi o Staden 1.6 package (Staden 1996). Com o *Troll* foram utilizados parâmetros de no mínimo quatro repetições para microssatélites hexa, penta e tetranucleotídeos e de no mínimo seis repetições para tri e dinucleotídeos. Em seguida, os insertos contendo microssatélites foram selecionados pelo maior número de repetições e pelo motivo, ou seja, primeiro foram escolhidos os penta e tetranucleotídeos e por último os dinucleotídeos com maior número de repetições, sendo escolhido apenas um dinucleotídeo com motivo AT para evitar a formação de “loops” durante a reação de amplificação. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio de uma página da internet desenvolvida para exportar arquivo Gap4 direto do programa Staden ([HTTP://wsmartins.net/primerdesign](http://wsmartins.net/primerdesign)) (Figura 10). Foram utilizados como parâmetros restritivos uma porcentagem mínima de 30% de G (guanina) e C (citosina) e máxima de 80%, temperatura mínima de anelamento de 48⁰C e máxima de 68⁰C, tamanho mínimo do iniciador de 18pb e máximo de 27pb. Para cada par desenhado, foi adicionado na extremidade 5' de um dos iniciadores uma cauda M13 (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') (Schuelke, 2000) para usar o método universal dye-labelling descrito por Boutin-Ganache e colaboradores (2001).

Primer Design using experiment format files exported from Gap4

This service is to be used in conjunction with the [Microsatellite module](#) (tr01p1fm) for the [Staden Package](#). The tr01p1fm is a Pregap4 module that finds microsatellites (SSR - Single Sequence Repeat "tags" them so they can be visualised in the Gap4 Staden Package program. The module produces a "pregap.SSR.passed" file that can be used as an input file for Gap4 producing a compact database only SSR containing sequences. Sequences can be exported from such a Gap4 database in "experiment file format". This file format contains sequence qualities, and the positions of the SSRs. Using it as input, this Web service designs primers for SSR markers according to the parameters specified below. If there is more than one SSR in a sequence, pairs of primers are designed flanking each SSR. You can test the service by saving a [sample file](#) on your local disk, and entering it on "Select Gap4 exported file" input box.

Product Size Range:

Primer Size: Min: Opt: Max:

Primer Tm: Min: Opt: Max:

Primer GC%: Min: Max:

Use Sequence Quality:

Select Gap4 exported file: (limit of 2MB file)

Figura 10: Programa para desenho dos iniciadores. Fonte: <http://wsmartins.net/primerdesign>.

3.8 Amplificação dos iniciadores desenvolvidos

Para verificar a amplificação dos iniciadores desenvolvidos, foram utilizadas duas amostras de DNA e um gradiente de temperatura de 50 a 60 °C, variando de 2° em 2°C. A reação foi preparada para um volume final de 10µl contendo 1 unidade de Taq DNA polimerase, tampão 1X para PCR (10mM Tris-HCL pH 8,3; 5mM KCL), 1mM de dNTPs, 0,6µM de iniciador, 0,6µl de terminador, 30ng de DNA e água destilada autoclavada para completar o volume final.

O programa utilizado foi de desnaturação inicial à 95°C por 7 minutos, desnaturação do DNA à 95°C por 1 minuto, temperatura de anelamento do iniciador variando de 52° a 58°C por 40 segundos, extensão de 72°C por 40 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos e conservação da reação à 10°C. Os três passos de desnaturação do DNA, anelamento e extensão foram repetidos 35 vezes. A amplificação do fragmento foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% (5 V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml), utilizando uma amostra contendo água ao invés de DNA como controle e o marcador 1kb ladder (0,8µg) para analisar os tamanhos dos fragmentos de DNA.

3.9 Seleção dos locos polimórficos

Para selecionar os locos polimórficos, os produtos de amplificação foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida 4% corados com nitrato de prata, segundo descrito por Bassam et al., (1991). Para identificação do grau de polimorfismo (monomórfico ou polimórfico) dos locos, foram utilizadas 12 amostras de *N. fasciata*.

3.10 Caracterização dos locos polimórficos

A caracterização dos locos polimórficos descritos na etapa anterior foi feita com base em 24 amostras de DNA de uma população da Estação Ecológica de Águas Emendadas (15°34'S, 47°42'W).

A genotipagem foi feita em gel desnaturante de poliacrilamida 5% no ABI 377 e as análises foram feitas com o auxílio dos programas GeneScan e Genotyper 2.1 (Applied Biosystems). O número de alelos por loco, a heterozigosidade esperada e observada (Nei 1973), a exclusão de paternidade (Weir 1996) e a probabilidade de identidade genética (Paetkau et al., 1995) foram estimados utilizando o Identity 1.0 (Wagner & Sefc 1999). O desvio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação foram analisados usando o programa Genepop 4.0 (Raymond & Rousset 1996). Correção de Bonferroni foi aplicada nos testes múltiplos. A presença de alelos nulos e *dropout* foi avaliada com auxílio do programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

3.11 Análises de amplificação cruzada

Após a caracterização dos locos em *N. fasciata*, foi realizado um teste de amplificação cruzada desses pares de iniciadores em outras espécies de aves neotropicais de quatro famílias distintas, sendo essas distribuídas em dois grandes grupos: oscines e suboscines. As espécies selecionadas foram: *Sicalis flaveola*, *Ammodramus humeralis* (Emberizidae), *Thraupis*

sayaca, *Gypsnagra hirundinacae*, *Paroaria capitata*, *Ramphocelus carbo* (Thraupidae), essas pertencentes ao grupo oscines, e *Casiornis rufus* (Tyrannidae) e *Xiphorhynchus picus* (Dendrocolaptidae), pertencentes ao grupo suboscines. A reação para verificar o sucesso de amplificação foi feita conforme descrito anteriormente, porém foram testadas três temperaturas de anelamento: 50, 53 e 56°C. O sucesso de amplificação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% (5 V/cm) na presença de brometo de etídio (1 µg/ml), utilizando o marcador 1kb ladder (0,8µg).

4- Resultados

4.1 Construção da Biblioteca Genômica

Na construção da biblioteca genômica foram obtidas 960 colônias contendo inserto. As 960 colônias foram separadas em dez placas de 96 poços para a realização dos lisados (Figura 11) e das reações de PCR (Figura 12).

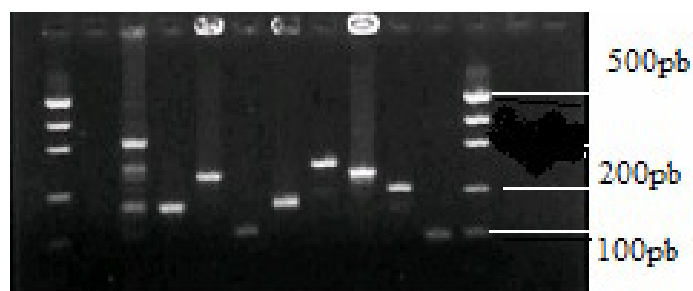


Figura 11: Amplificação via PCR do lisado de bactérias da Placa 1 (10 amostras e marcador 1 Kb).

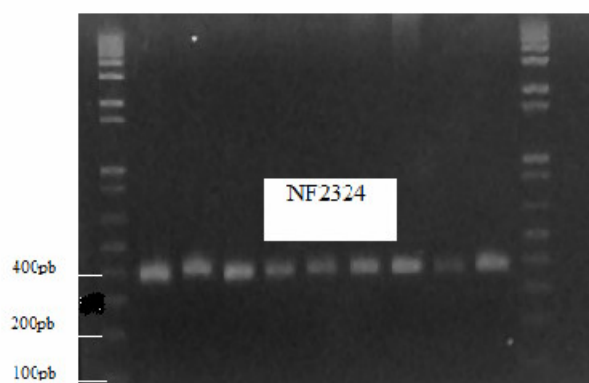


Figura 12: Amplificação via PCR do Primer NF2324 (360bp) (9 amostras de DNA e marcador 1 Kb)

4.2 Isolamento dos locos de microsatélite, desenho dos iniciadores e otimização

Foram seqüenciados 928 clones (Figura 13), dentre estes 278 contigs e destes, 51 continham microsatélites (18%) (Tabela 1). Dentre esses, foram selecionados 17 locos de microsatélites perfeitos, sendo sete dinucleotídeos, cinco tri, três tetra e dois pentanucleotídeos (Tabela 1, Figura 14). Dos 17 pares de iniciadores desenhados, 16 amplificaram em temperatura variando entre 52° a 54°C e apenas um par de iniciador (NF3334) não amplificou após vários testes de otimização (Tabela 2).

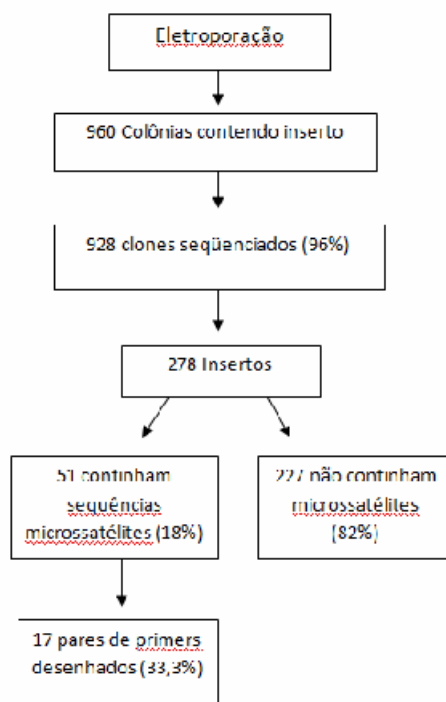


Figura 13: Fluxograma das etapas do desenvolvimento dos iniciadores para amplificação de locos de microsatélite para *N. fasciata*.

Tabela 1: Lista dos 51 locos de microssatélites isolados em *N. fasciata*, número de repetições dos motivos, os locos em negritos e sublinhados foram selecionados para o desenho dos iniciadores.

Nome do Inseto	Motivo	Nome do Inseto	Motivo	Nome do Inseto	Motivo
<u>A03.NFP10.T31</u>	<u>(CT)</u> ₈	<u>E09.NFP5.T31</u>	<u>(TAA)</u> ₅	H10.NFP1.T71	(CTT) ₄
A08.NFP5.T71	(TA) ₈	F01.NFP2.T31	(TGT) ₆	A03.NFP10.T71	(AC) ₁₆
A12.NFP12.T31	(TTTAT) ₇ (TTTTA) ₉	F02.NFP9.T71	(GAG) ₄	H10.NFP1.T71	(CTT) ₄
A12.NFP13.T71	(AC) ₆	F04.NFP5.T71	(CTT) ₄	H10.NFP7.T71	(TA) ₁₈
<u>B07.NFP10.T31</u>	<u>(CCT)</u> ₅	<u>F04.NFP7.T31</u>	<u>(CA)</u> ₆	B03.NFP5.T71	(CTC) ₄
<u>B07.NFP11.T31</u>	<u>(GGTTT)</u> ₉	<u>F07.NFP5.T71</u>	<u>(TGGGT)</u> ₄	H12.NFP2.T31	(AC) ₆
<u>B08.NFP5.T71</u>	<u>(CA)</u> ₁₀	F08.NFP11.T71	(CCT) ₄	B06.NFP10.T71	(TCTG) ₄
<u>B08.NFP11.T71</u>	<u>(CAA)</u> ₆	F08.NFP11.T71_1	(GT) ₆	B11.NFP5.T71	(TA) ₁₈
B09.NFP11.T31	(TA) ₆	F09.NFP10.T31	(CCT) ₄	B11.NFP16.T71	(ATTAC) ₆
B09.NFP11.T31-	(TA) ₈	<u>F10.NFP9.T31</u>	<u>(GT)</u> ₆	B12.NFP10.T31	(AT) ₇
B10.NFP7.T31	(CA) ₉ (TA) ₇	G04.NFP2.T71	(GCT) ₄	C01.NFP2.T71	(AT) ₁₀
<u>B11.NFP16.T31</u>	<u>(CA)</u> ₆	G04.NFP16.T31	(TGT) ₄	E08.NFP1.T71	(CA) ₁₀
<u>C01.NFP2.T31</u>	<u>(AT)</u> ₁₂	G05.NFP16.T31	(TCA) ₄	E10.NFP16.T71	(TA) ₁₆
<u>C01.NFP9.T31</u>	<u>(AAT)</u> ₅	<u>G06.NFP5.T71</u>	<u>(GAAT)</u> ₂₀	F08.NFP11.T31	(AC) ₆
<u>E05.NFP2.T71</u>	<u>(TCC)</u> ₇	G08.NFP5.T71	(AT) ₉	F09.NFP12.T71	(ATC) ₄
<u>E07.NFP5.T71</u>	<u>(CA)</u> ₆	G10.NFP5.T71	(CTG) ₄	G01.NFP13.T71	(AT) ₉
<u>E08.NFP9.T31</u>	<u>(TATT)</u> ₄	<u>H09.NFP11.T31</u>	<u>(CTGT)</u> ₅	G02.NFP11.T31	(TTCC) ₇

Tabela 2. Tipos de Microsatélites encontrados para *N. fasciata*, sequências dos iniciadores desenhados e temperatura de anelamento de cada iniciador.

Loco	Estrutura de repetição	Seqüência dos pares de iniciador (5'- 3')	Ta (°C)
NF0102	(CT) ₈	F:TACCCTGCTTTGCTGTGCTA R:TCCAGTCTCCCTTTAAGCCC	54
NF0304	(CCT) ₅	F:CCAGGTAGCTTCTGACCTTGA R:AGAGCTGCACAGATCCCCT	52
NF0506	(GGTTT) ₉	F:CATACCCATGAGTGCGTGAC R:GAGCAGAGCAGAGCTTGGAT	52
NF0708	(CA) ₁₀	F:GTTTAGCAATACACACACTCA R:TCAGTATGGCCTTTTCAGAT	54
NF0910	(CAA) ₆	F:CAGTCTGCACTTCCTCCACA R:GGGTGTAGCTGGACACACATT	54
NF1112	(AT) ₁₂	F:ATGTTTCTGGCACTGAACGG R:GGGATTACGATGGTGTTA	54
NF1314	(AAT) ₅	F:TGGGAGAGAAAGTTGGTTTAAT R:CTGATCTGGCCAAAGGACTA	54
NF1516	(TCC) ₇	F:GTGGCTGTGGATGCTCCT R:GGATGAGAGCACATTTGGGT	54
NF1718	(CA) ₆	F:ACCTCACTTCCCAGTTTCT R:TGCTTAAACAGCCTCTCCGT	54
NF1920	(TATT) ₄	F:TTCAGTGCCAGGCTTAATGA R:TGCTTAAACAGCCTCTCCGT	54
NF2122	(TAA) ₅	F:AAACTGTTGTCCAAGTCCCC R:GGCAGCGGCTATAAAGAACA	54
NF2324	(CA) ₆	F:TGAAAAGCCCAATTAACCAAA R:CTGTGGAGGGAAGCTGAAAC	54
NF2526	(TGGGT) ₄	F:GACTTGCAGATCTTCTGGG R:TGCCATGACAGAGGTAGCAC	60→54
NF2728	(GT) ₆	F:CAGGTGTCTCCACCACACAG R:AAGGAAATGGGAATGAAGATCA	52
NF2930	(GAAT) ₂₀	F:GGTCAAATGATCAGCAAAAT R:AGCATGTAATCAACTTGCTAAA	54
NF3132	(CA) ₆	F:TCCTCATTGATTCACCTC R:CGGGTACAAAGGGGATACAA	54
NF3334	(CTGT) ₅	F:CAGGTTCTCTGCTGAGTCCA R:GTCAAGCTGCCTGGATTGAT	-

4.3 Seleção dos locos polimórficos

Dos 16 locos que apresentaram amplificação, dois eram monomórficos (NF2324 e NF3132) (Figura 15).

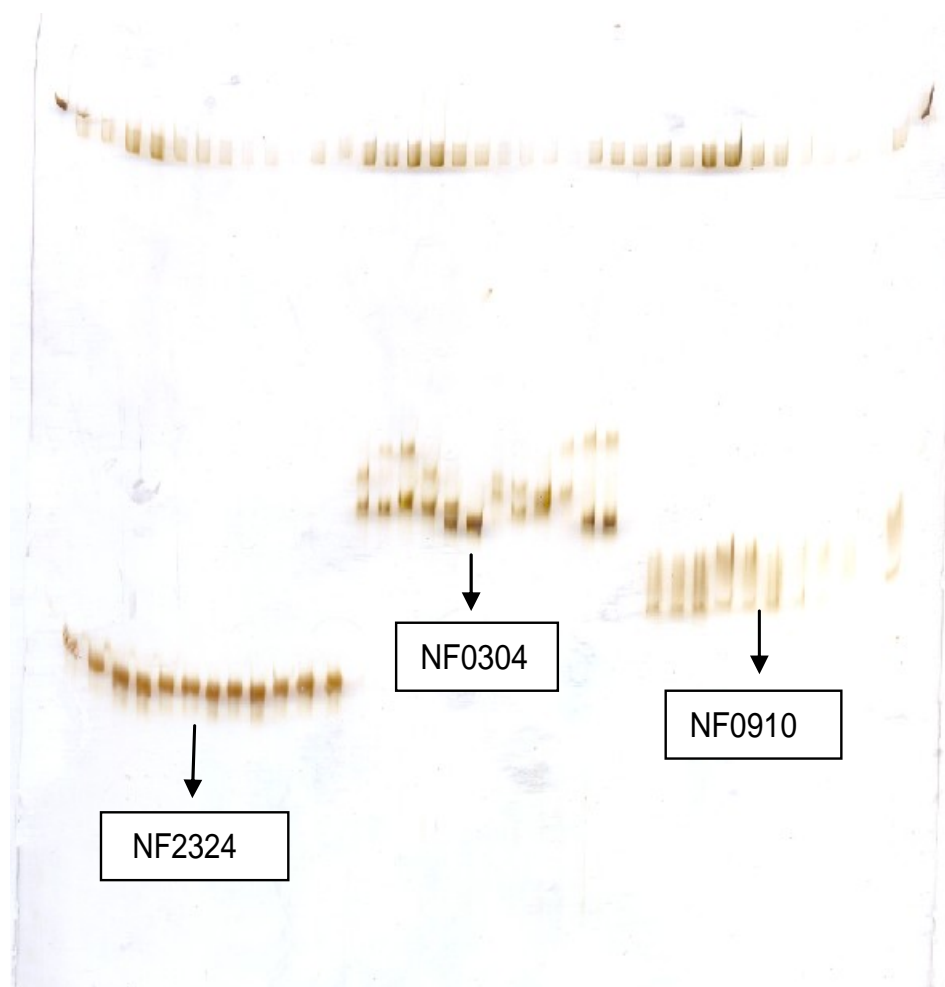


Figura 15: Gel desnaturante poliacrilamida 4% (12 amostras de DNA para cada loco: NF2324, NF0304 e NF 0910).

4.4 Caracterização dos locos polimórficos

Os demais locos mostraram de moderado a elevado nível de polimorfismo (Tabela 3). O número de alelos por loco variou de 02 (NF0910 e NF2728) a 18 (NF1112) com média de 5,3 alelos por loco (Tabela 3). A heterozigosidade observada variou de 0.083 a 1.0. O loco NF2930 apresentou o maior valor de heterozigosidade observada (1.0) e o loco NF1314 apresentou o menor valor de heterozigosidade observada. Os locos NF0506 e NF1314 apresentaram valores de heterozigosidade observada significativamente diferente da

heterozigidade esperada, ($P < 0.0036$) (Tabela 3). A análise utilizando o software Micro-Checker mostrou a existência de alelos nulos nesses dois locos, com as frequências de alelos nulos estimadas em 0.3832 e 0.3631, respectivamente. Todos os pares de locos estão em equilíbrio de ligação ($p > 0.0036$, valor ajustado de Bonferroni para um valor nominal de 5%).

Tabela 3. Caracterização dos 17 locos de microssatélites em 24 indivíduos de *N. fasciata*.

Loco	A	Tamanho dos alelos (pb)	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>p</i>	<i>Q</i>	<i>I</i>
NF0102	4	213-221	0.350	0.409	1.0	0.190	0.443
NF0304	4	208-220	0.598	0.333	0.012	0.351	0.212
NF0506	8	257-287	0.796	0.150*	0	0.615	0.065
NF0708	3	139-143	0.290	0.250	0.255	0.149	0.523
NF0910	2	139-142	0.117	0.125	1.0	0.055	0.786
NF1112	18	302-338	0.915	0.950	0.475	0.829	0.013
NF1314	3	250-256	0.518	0.083*	0	0.212	0.346
NF1516	3	100-106	0.509	0.434	0.270	0.211	0.350
NF1718	4	204-210	0.505	0.545	0.698	0.270	0.298
NF1920	4	358-374	0.193	0.208	1.0	0.102	0.656
NF2122	5	211-226	0.744	0.739	0.316	0.510	0.108
NF2324	1	360	--	--	-	--	--
NF2526	5	179-199	0.677	0.863	0.161	0.420	0.161
NF2728	2	228-230	0.486	0.333	0.107	0.183	0.382
NF2930	10	218-254	0.868	1.00	0.942	0.732	0.031
NF3132	1	249	--	--	-	--	--
NF3334	-	-	-	-	-	-	-
Todos os locos	5,3	-	0.540	0.394		0.999	1.72×10^{-10}

A, número de alelos; *He*, heterozigidade esperada; *Ho*, heterozigidade observada; *p*, probabilidade de desvio para Hardy-Weinberg com a correção de Bonferroni ($p > 0.0036$); *Q*, probabilidade de exclusão de paternidade; *I*, probabilidade de identidade genética. * Loco em desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

A probabilidade de exclusão de paternidade combinada para todos os locos e a probabilidade de identidade genética foram 0.999 e 1.72×10^{-10} , respectivamente. O loco NF0910 apresentou a menor probabilidade de exclusão de paternidade (0.055) e a maior probabilidade de identidade genética (0.786), enquanto o loco NF1112 apresentou a maior probabilidade de exclusão de paternidade (0.829) e a menor probabilidade de identidade genética (0.013). Comparando estes resultados com o número de alelos de cada loco pode-se inferir que estes dados eram esperados visto que o loco NF0910 (juntamente com o NF2728)

apresentou o menor número de alelos (2) e o loco NF1112 apresentou o maior número de alelos (18). O loco NF2930 que apresenta o segundo maior número de alelos (10) apresentou valores próximos a NF1112 (0.732 para a probabilidade de exclusão de paternidade e 0.031 para probabilidade de identidade genética).

4.5 Amplificação cruzada dos iniciadores de *N. fasciata*

Onze pares de iniciadores amplificaram em *S. flaveola*, *T. sayaca*, *G. hirundinaceae*, *P. capitata* e *R. carbo* (Tabela 4). A temperatura de 53°C foi a mais freqüente nas amplificações para a maioria dos locos e apenas em alguns indivíduos surgiram bandas inespecíficas, necessitando de novos testes de otimização. Os pares de iniciadores NF2122 e NF2930 não amplificaram em nenhuma das espécies testadas com as temperaturas de anelamento igual a 50, 53 ou 56°C.

Tabela 4. Amplificação cruzada de 16 locos de microssatélites desenvolvidos para *N. fasciata* em oito espécies de Passeriformes neotropicais. Para cada espécie é indicada a temperatura de anelamento do iniciador.

Locos	<i>S.</i>	<i>A.</i>	<i>T.</i>	<i>G.</i>	<i>P.</i>	<i>R.</i>	<i>C. rufus</i>	<i>X.</i>	
	<i>flaveola</i>	<i>humeralis</i>	<i>sayaca</i>	<i>hirundinaceae</i>	<i>capitata</i>	<i>carbo</i>		<i>picus</i>	
	Oscines						Suboscines		
NF0102	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	Na	
NF0304	53°C	Na	53°C	53°C	53°C	53°C	Na	Na	
NF0506	53°C	Na	53°C	53°C	Na	53°C	Na	Na	
NF0708	Na	Na	53°C	53°C	Na	Na	Na	Na	
NF0910	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	
NF1112	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	
NF1314	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	Na	Na	
NF1516	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	56°C	53°C	
NF1718	Na	Na	Na	Na	53°C	Na	Na	Na	
NF1920	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	
NF2122	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	
NF2324	50°C	Na	Na	50°C	Na	50°C	Na	Na	
NF2526	Na	Na	Na	Na	53°C	Na	Na	Na	
NF2728	50°C	Na	53°C	Na	53°C	50°C	Na	Na	
NF2930	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	
NF3132	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	53°C	Na	Na	

Na, Não-amplificação

5- Discussão

A técnica utilizada no trabalho para isolar os microssatélites não é a técnica mais utilizada nos estudos de desenvolvimento de iniciadores, porém, esta técnica foi escolhida para diminuir os custos do processo e fazer uma busca no genoma total visando encontrar diferentes unidades de repetição. Zane e colaboradores (2002) publicaram uma revisão sobre as estratégias para isolar microssatélites na *Molecular Ecology* e na *Animal genetics* e evidenciaram crescimento na utilização de bibliotecas enriquecidas. Entretanto, uma biblioteca enriquecida restringe os motivos encontrados, além de ter um custo maior. Tradicionalmente, os locos de microssatélites foram isolados de bibliotecas genômicas parciais de espécies em interesse e por seleção de clones por meio de hibridização com sondas.

A frequência de locos de microssatélites identificados (18%) pode ser considerada alta se comparado com trabalhos publicados a partir de biblioteca enriquecida em aves. Frentiu e colaboradores (2003) obtiveram 200 clones a partir de biblioteca enriquecida para a espécie *Zosterops lateralis chlorocephalus* onde confirmou a presença de 13 locos (6,5% de microssatélites). Wonke e colaboradores (2007) trabalhando com a espécie *Emberiza citrinella* identificaram 41 clones contendo locos de microssatelite e caracterizaram 10 locos a partir de biblioteca enriquecida (Wonke et al., 2007). Gálvez e colaboradores (2009) isolaram 16 locos de microssatélites para a espécie *Pica pica*, dos 148 existentes, evidenciando poucos locos isolados para a ordem Passeriformes. Dentro da família Emberizidae, que contém aproximadamente 308 espécies, foram encontrados três trabalhos de isolamento de locos microssatélites (Wonke et al., 2007; Mayer et al., 2008 e Jeffery et al., 2001) totalizando 31 locos isolados e caracterizados.

Dentre os 17 pares de iniciadores desenhados apenas um iniciador não amplificou para nenhum dos indivíduos testados (NF3334), evidenciando um sucesso de amplificação dos locos isolados (94%). Entretanto, os iniciadores só foram testados em temperatura variando de 52° a 58°C, com isso o sucesso da amplificação deste iniciador pode ser corrigida com novas condições de temperatura, ou este fato pode ser explicado pela ocorrência de mutação no sítio de anelamento do iniciador.

Primmer e colaboradores (1997) compararam a densidade de microssatélites no genoma de aves e humanos e chegaram a conclusão de que a frequência de microssatélites no genoma de aves é geralmente inferior ao de mamíferos. Utilizando dados do GenBank, os autores fizeram busca em quatro espécies de aves totalizando 117 locos microssatélites, o que significa uma densidade média de 1 microssatélite a cada 31kb. Essa densidade é inferior a densidade de microssatélites encontrada no genoma humano (1 microssatélite a cada 6kb). No trabalho de Primmer e colaboradores (1997), foi utilizada a técnica de hibridização e também entradas em bancos de dados.

Estudos com espécies de aves mostram números de alelos próximos aos encontrados no presente trabalho (2 a 18). Simeoni e colaboradores (2009) caracterizaram 38 locos de microssatélite para a espécie *Turdus merula* onde encontrou de 2 a 16 alelos por loco. Wonke e colaboradores (2007) desenvolveram e caracterizaram 10 locos microssatélites para a espécie *Emberiza citrinella* com o número de alelos variando de 2 a 21. Jeffery e colaboradores (2001) isolaram e caracterizaram seis locos de microssatélite para a espécie *Melospiza melodia*, da família Emberizidae, onde o número de alelos variou de 4 a 13. Porém, existem trabalhos onde o número de alelos encontrados para espécies de aves é baixo, como para *Zosterops lateralis chlorocephalus* Para essa espécie, o número de alelos identificados por loco foi de dois a cinco (Frentiu et al., 2003).

A heterozigosidade observada não variou muito da heterozigosidade esperada e menos da metade dos locos (44%) apresentaram heterozigosidade observada menor que a esperada, sendo os valores não significantes. Este dado mostra que a população em estudo provavelmente não apresenta déficit de heterozigozidade, e também que o acasalamento entre indivíduos aparentados não ocorre com tanta frequência. A análise estatística da presença de erros durante a amplificação dos locos evidenciou a presença de alelos nulos nos locos NF0506 e NF1314, exatamente os locos que apresentaram uma deficiência significativa de heterozigotos. Estudos com espécies da família Emberizidae mostram valores de heterozigosidade observada próximos aos valores encontrados para *N. fasciata*. Um exemplo é o trabalho com a espécie *Emberiza citrinella* onde a heterozigosidade observada variou de 0,20 a 0,91. Os locos de microssatélite desenvolvidos apresentaram valores de exclusão de paternidade (0.999) e probabilidade de identidade genética (1.72×10^{-10}), os quais são ideais para estudos sobre a estrutura genética e a análise de parentesco nessa espécie.

O teste de amplificação cruzada apresentou uma porcentagem alta de amplificação visto que dentre os 16 pares de iniciadores utilizados nos testes, 11 (68,7%) amplificaram em cinco espécies distintas. Este resultado evidencia que as sequências que flanqueiam as regiões de microssatélites são conservadas. As espécies das famílias Thraupidae e Emberizidae foram mais bem sucedidas na amplificação cruzada do que as espécies das famílias Tyrannidae e Dendrocolaptidae. Estes resultados eram esperados visto que as duas primeiras famílias são do grande grupo Oscines e as duas últimas são do grupo suboscines, ou seja, são espécies mais distantes da espécie em estudo, *N. fasciata*. Este fato é claro, pois o sucesso de amplificação cruzada entre espécies está diretamente relacionado com a distância evolutiva entre as mesmas (Primmer et al., 1997). De acordo com Barker e colaboradores (2004), a divisão entre oscines e suboscines ocorreu cerca de 77 milhões de anos atrás. Estudos de amplificação cruzada são realizados em maior porcentagem com espécies da mesma família e

no presente trabalho foram utilizadas 4 famílias distintas mostrando que os iniciadores isolados para *N. fasciata* poderão ser utilizados até mesmo para espécies de outras famílias. Este fato é importante visto o alto custo para o desenvolvimento desses marcadores. Outros trabalhos já demonstraram a amplificação cruzada de locos microssatélites em aves, Wonke e colaboradores (2007) avaliaram a amplificação de 10 iniciadores desenvolvidos para *Emberiza citrinella* em três espécies da mesma família obtendo sucesso de amplificação de 4 pares de iniciadores nas três espécies testadas. Galbusera e colaboradores (2000) testaram a amplificação cruzada em 13 espécies de Passeriformes de 40 locos microssatélites, demonstrando um aumento na probabilidade de amplificação e polimorfismo com a diminuição da distância genética.

Outro fator que também pode influenciar no sucesso de amplificação cruzada de um conjunto de iniciadores são as diferenças de mudanças entre os marcadores e as taxas evolutivas devido à heterogeneidade na organização das sequências e as taxas de mutação e fixação. Pensava-se que marcadores microssatélites apresentassem um efeito seletivamente neutro, porém estudos demonstraram um papel funcional desses marcadores (Kashi e Soller., 1999), não podendo excluir as diferenças em pressões seletivas como uma possível explicação para a variação no sucesso de amplificação cruzada (Galbusera et al., 2000).

Estudos em seres humanos e aves demonstraram que o grau de polimorfismo dos microssatélites não é transferível, elevados níveis de polimorfismo detectados em uma espécie não pode ser encontrado necessariamente nos locos de outra espécie após a amplificação cruzada dos iniciadores (Ellegren et al., 1995). Trabalhando com aves, Lillandt et al. (2002) foram bem sucedidos na utilização de iniciadores desenvolvidos inicialmente para 18 espécies de Corvidae em *Perisoreus infaustus*, embora alguns iniciadores não apresentaram qualidade nos produtos amplificados, isto suporta a hipótese de que a transferibilidade não é excessivamente dependente da proximidade filogenética (Oliveira et al., 2006). Galbusera e

colaboradores (2000) obtiveram 84% de sucesso na amplificação, evidenciando que a amplificação cruzada para o grupo de Passeriformes é altamente aplicável. A amplificação cruzada pode ser especialmente útil para estudos em aves visto que trabalhos têm demonstrado que o genoma de aves contém cerca de 10 vezes menos microssatélites, por exemplo, que o genoma de seres humanos (Primmer et al., 1997).

6- Conclusões

- A metodologia utilizada para isolar locos de microssatélites a partir de biblioteca genômica sem enriquecimento se mostrou eficiente, possibilitando identificar um número alto de locos microssatélites com diferentes tipos de estrutura repetição de forma aleatória pelo genoma de *N. fasciata*;
- Foi possível desenvolver 17 pares de iniciadores com 94% de sucesso de amplificação via PCR e
- Os iniciadores sintetizados para *N. fasciata* mostraram taxa moderada a alta de amplificação cruzada em outras espécies de aves neotropicais, evidenciando o potencial de aplicação desses locos para realização de estudos genéticos nessas espécies e principalmente das famílias Emberizidae e Thraupidae.

7- Referências Bibliográficas

- Ab'Saber, A. N. 1977. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* 52: 1-21.
- Alves, M. A. dos S. 1988. Organização social e biologia reprodutiva de *Neothraupis fasciata* (Passeriformes: Thraupidae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Alves, M. A. dos S. and Cavalcanti, R. B. 1990. Ninhos, ovos e crescimento de filhotes de *Neothraupis fasciata*. *Ararajuba* 1: 91-94.
- Alves, M. A. 1990. Social System and helping behavior in the White-Banded Tanager (*Neothraupis fasciata*). *The Condor* 92: 470-474.
- Bailey, A. D., Pavelitz, T and Weiner, A. M. 1998. The microsatellite sequence (CT)_n x (GA)_n promotes stable chromosomal integration of large tandem arrays of functional human U2 small nuclear RNA genes. *Molecular and Cell Biology* 18: 2226-2271.
- Barker, F. K., Cibois, A., Schikler, P., Feinstein, J., Cracraft, J. 2004. Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 11040–11045.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196: 80-83
- Bates, J. M. 2000. Allozymic genetic structure and natural habitat fragmentation: data for five species of Amazonian forest birds. *Condor* 102: 770–783.
- Bierregaard Jr, R. O., Lovejoy, T. E. V., Kapos, A. A., Hutchings, R. W. 1992. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. *Bioscience* 42: 859-866.
- Biggin, M. D and Tjian, R. 1988. Transcription factors that activate the ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell* 53: 699-711.
- Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., Descepper, C. F. 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allelesizing methods. *Biotechniques* 31: 1–3.
- Bowling, A., et al. 1997. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim Genet* 4: 247-252.
- Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfield, J. F. Y and Burke, T. 1992. Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach* (A. R. Hoelzel, Ed.) 225–269.
- Callen, D. F., et al. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 5: 922- 927.
- Cavalcanti, R. B. 1999. Bird species richness, turnover, and conservation in the Cerrado region of central Brasil. *Studies Avian Biol* 19: 244-249.
- Chakraborty, R., et al. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Ann Hum Genet* 56: 45-57.
- Cibois, P., Schikler, P., Feinstein, J., Cracraft, J. 2004. Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 11040–11045.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W. G., Matarazzo, M. T., Peterlunger, E and Testolin, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterisation and cross species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 65-72.
- Collevatti, R. G., Grattafaglia, D and Hay, J. D. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86: 60-67.

- Crow, J and Kimura, M. 1970. An Introduction to Population Genetics Theory. *Burgess Publishing Company*, Minneapolis 591 p.
- Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M and Freimer, N. B. 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of National Academy of Sciences* 91: 3166-3170.
- Ellegren, H., Primmer, C. R and Sheldon, B. 1995. Microsatellite evolution: Directionality or bias in locus selection? *Nature Genetics* 11: 60-62.
- Ferreira, A. A. 2001. Fragmentação de matas de galeria e diversidade genética de *Antilophia galeata* (Aves: Pipridae) no Planalto Central. *Tese de doutorado*, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Ferreira, M., Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: *Embrapa-Cenargem* 220 p.
- Field, D and Wills, C. 1998. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 263: 209-215.
- Foster, L and Trimarchi, J. M. 1994. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science* 265: 407-409.
- Francisco, M. R., Gibbs, H. L and Galetti-Junior, P. M. 2009. Patterns of individual relatedness at blue manakin (*Chiroxiphia caudata*) leks. *The auk* 126: 47-53.
- Frentiu, F. D., Lange, C. L., Owens, P. F. 2003. Isolation of microsatellite loci in the Capricorn silvereye, *Zosterops lateralis chlorocephalus* (Aves: Zosteropidae). *Molecular Ecology Notes* 3: 462-464.
- Galbusera, P., Dongen, S. V., Matthysen, E. 2000. Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1: 163-168.
- Gilmour, D. S., Thomas, G. H and Elgin, S. C. 1989. *Drosophila* nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science* 245: 1487-1490.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: Genomic context and mutational mechanisms. *Oxford University Press, New York* p: 1-9.
- Heywood, V. H and Iriondo, J. M. 2003. Plant conservation: Old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113: 321-335.
- Hoelzel, A. R., Potter, C. W and Best, P. B. 1998. Genetic differentiation between parapatric 'nearshore' and 'offshore' populations of the bottlenose dolphin. *The Royal society*.
- Ibama. 2003. Animais Silvestres: vida à venda. – Brasília Dupligráfia, 260p.
- Jarne, P and Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- Jeffery, K. J., Keller, L. F., Arcese, P., Bruford, M. W. 2001. The development of microsatellite loci in the song sparrow, *Melospiza melodia* (Aves) and genotyping errors associated with goog quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 1: 11-13.
- Kashi, Y and Soller, M. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein D B and Schlötterer C (eds). *Microsatellites: Evolution and Applications*. *Oxford University New York* p: 10-23.
- Levinson, G and Gutman, G. A. 1987. Slippedstrand mispairing : A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular and Biology Evolution* 4: 203-221.
- Lillandt, B., Bensch, S., Hansson, B., Wennerberg, L., Schantz, T. V. 2002. Brief report Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the Siberian jay (*Perisoreus infaustus*). *Hereditas* 137: 157-160.
- Lima, M. G. 2003. Ecologia da paisagem e cenários para conservação da avifauna do Parque Nacional das Emas, GO. *Tese*, Universidade de Brasília 116p.
- Machado, R. B. 2000. A fragmentação do Cerrado e efeitos sobre a avifauna da região de Brasília DF. *Tese de doutorado*, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

- Machado, R. B. *et al.* 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Conservação Internacional, Brasília, DF.
- Marini, M. A. 2001. Effects of forest fragmentation on birds of the Cerrado region, Brazil. *Bird Conservation International* 11: 13-25.
- Martin-Gálvez, D., Dawson, D. A., Horsburgh, G. T., Burke, T. 2009. Isolation, characterization and chromosome locations of polymorphic black-billed magpie *Pica pica* (Corvidae, Aves) microsatellite loci. *Molecular Ecology Resources*.
- Marshall, T. C., *et al.* 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 5: 639-655.
- Mayer, C., Schiegg, K., Pasinelli, G. 2008. Isolation, characterization and multiplex genotyping of 11 autosomal and four six-linked microsatellite loci in the reed bunting, *Emberiza schoeniclus* (Emberizidae, Aves). *Molecular Ecology Resources* 8: 332-334.
- McDonald, D. B. 2003. Microsatellite DNA evidence for gene flow in neotropical lek-mating long-tailed manakin. *Condor* 105: 580-586.
- Metzgar, M., Bytof., J and Wills, C. 2000. Selection against frame shift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10: 72-80.
- Mills, L. S and Smouse, P. E. 1994. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *The American Naturalist* 144: 412-413.
- Moura, N. G., Laranjeiras, T. O., Carvalho, A. R., Santana, C. E. R. 2005. Composição e diversidade da avifauna em duas áreas de cerrado dentro do campus da Universidade Estadual de Goiás – Anápolis. Revista Saúde e Ambiente. *Health and Environment Journal* 6 (1): 34-40.
- Moxon, R and Willis, C. 1999. DNA microsatellites: Agents of evolution? *Scientific American* 280: 94-99.
- Myers, N. R. A., Mittermeier, C. G., Mittermeier, G. A. B., Fonseca, E., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspot for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 70: 3321-3323.
- Oliveira, E. J., Pádua, J.G., Zucchi, M. I. Z., Vencovsky, R and Vieira, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 2: 294-307.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Perez, F. *et al.* 2005. Development of EST-SSR markers by data mining in three species of shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. *Marine Biotechnology* v. 7, n 5: 554-569
- Pinto, O. M. de O. 1944. *Catálogo das Aves do Brasil* 2ª Edição, Departamento de Zoologia, São Paulo.
- Primack, R. B., Rodrigues, E. 2001. Biologia da conservação. Londrina: Biblioteca Nacional, 328p.
- Primmer, C. R., Raudsepp, T., Chowdhary, B. P., Moller, A. P and Ellegren, H. 1997. Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Research* 7: 471-482.
- Primmer, C. R and Merilä, J. 2000. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics* 3:445-449.
- Raymond, M and Rousset, F. 1996. Genepop: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- Roma, J. C. 2006. A fragmentação e seus efeitos sobre aves de fitofisionomias abertas do Cerrado. *Tese de doutorado*, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

- Rosenberg, S. M., Longerich, S., Gee, P and Harris, R. S. 1994. Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science* 265: 405-407.
- Rozen, S and Skaletsky, H. J. 2000. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. Pages 365–386 in *Bioinformatics Methods and Protocols* (S. Krawetz, and S. Misener, Eds.), Humana Press, New Jersey.
- Saunders, D. A., Hobbs, R. J and Margules, C. R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5: 18-32.
- Saunders, N. J., Peden, J. F., Hood, D. W and Moxon, E. R. 1998. Simple sequence repeats in the *Helicobacter pylori* genome. *Molecular Microbiology* 27: 1091-1098.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Sick, H. 1997. Ornitologia Brasileira, uma Introdução. *Nova Fronteira*, Rio de Janeiro.
- Silva, E. M. D. 1980. Composição e comportamento de grupos heteroespecíficos de aves em área de cerrado, no Distrito Federal. *Dissertação de mestrado*, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Silva, J. M. C. 1995. Birds of the Cerrado Region, South America. *Steenstrupia* 21: 69-92.
- Silva, J. M. C., Bates, J. M. 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. *BioScience* 52: 225-233.
- Simberloff, D. 1994. Habitat fragmentation and population extinction of birds. *Ibis* 137: 105-111.
- Simeoni, M., Dawson, D. A., Gentle, L. K., Coiffait, L., Wolff, K., Evans, K. ., Gaston, K. J and Hatchwell, B. J. 2009. Characterization of 38 microsatellite loci in the European blackbird, *Turdus merula* (Turdidae, AVES). *Molecular Ecology*.
- STADEN, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5: 233-241.
- Strand, M., Prolla, T. A., Liskay, R. M and Petes, T. D. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- Tóth, G., Gáspari, Z and Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- Treco, D and Arnheim, N. 1986. The evolutionarily conserved repetitive sequence d(TG.AC)n promotes reciprocal exchange and generates unusual recombinant tetrads during yeast meiosis. *Molecular and Cell Biology* 6: 3934-3947.
- Tubelis, D. P., Cowling, A., Donnelly, C. 2004. Landscape supplementation in adjacent savannas and its implications for the design of corridors for forest birds in the Central Cerrado, Brazil. *Biological Conservation* 118: 353-364.
- Xu, Z. et al. 1999. Identification of abundant and informatives microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Animal genetics* v 30, n 2: 150-156.
- Wagner, H. W and Sefc, K. M. 1999. Identity 1.0. Available from <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>.
- Wahls, W., Wallace, L. J and Moore, D. 1990. The Z-DNA motif d(TG)₃₀ promotes reception of information during gene conversion events while stimulating homologous recombination in human cells in culture. *Molecular and Cell Biology* 10: 785-793.
- Walsh, P. S., Fildes, N. J., Reynolds, R. 1996. Sequences analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 14: 2807-2812.
- Wattier, R., et al. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 11: 1569-1573.

- Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)n. (dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- Weir, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. *Publishers Sunderland, United State.*
- Wonke, G., Wallschlager, D., Moll, K and Tiedemann, R. 2007. Ten new microsatellite loci for the yellowhammer (*Emberiza citrinella*) and their cross-species applicability among related taxa. *Molecular Ecology Primer Note.*
- Wilder, J and Hollocher, H. 2001. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular Biology and Evolution* 18: 384-392.
- Zane, L., Bargelloni, L and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zardoya, R., Vollmer, D. M., Craddock, C., Streelman, J. T., Karl, S and Meyer, A. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *The Royal Society* 116p.

Anexo A – Resumo de participação em congresso

Anexo B: Artigo Submetido na *Journal of Heredity* em 14 de Junho de 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)