

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ISOLAMENTO DE MICROSSATÉLITES EM AMAZONA AESTIVA,  
PAPAGAIO VERDADEIRO (PSITTACIFORMES)**

ORIENTADA: ISABELLA FERREIRA PENA  
ORIENTADOR: PROF. DR. EVANGUEDES KALAPOTHAKIS  
CO-ORIENTADORA: DR<sup>A</sup>. CIBELE SOARES DE CASTRO

BELO HORIZONTE

Novembro - 2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Isabella Ferreira Pena**

**Isolamento de microssatélites em *Amazona aestiva*, Papagaio Verdadeiro (Psittaciformes)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cibele Soares de Castro

**Belo Horizonte**  
**Departamento de Biologia Geral**  
**Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**  
**2009**

**Aos meus pais, Joaquim e Fátima, ao meu irmão André, ao Thiago, e a todos os meus amigos cujo apoio foi essencial para a conclusão deste trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor e orientador Evanguedes Kalapothakis por ser essa pessoa incrível, com quem eu aprendi muito mesmo. Você é um exemplo de profissional para mim, uma pessoa dedicada, íntegra e um orientador sempre presente (mesmo quando está longe!!!). Obrigada pela sua amizade.

Aos amigos que atualmente estão no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, (Cibele, Carolina, Érika, Flavinha (Flávia Dias), Flavis (Flavia Siqueira), Susanne, Anderson, Tatiana, Marcelle, Valéria, Bárbara, Arthur, Caio, Egian, Tatiani, Camila, Marcão, Luiz e Diego), aqueles que já passaram por lá (Thaís, Gabriel, Maria, Ana Luiza, Higgor, Marcelo, Kelly, Bárbara, Aleksandra, André, Ana Carolina, Arthur, Denise e Cleidi) e os parceiros de outros laboratórios que nos visitam (Ana Paula e Débora), meu muito obrigado por fazer esse laboratório um ambiente maravilhoso, somos uma grande família! Agradecimentos especiais para Érika e Cibele, que deram sugestões muito importantes para a elaboração dessa dissertação, Flavis que ajudou muito com o Linux e phred/phrap/consed, Ana Paula, companheira que me ajudou muito na construção da biblioteca e Diego e Luiz que me ajudaram em muitos experimentos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética em especial para Ana Lúcia pela amizade, e aos alunos dos laboratórios de Genética Humana e Médica, Genética Animal e Humana e Genética de Microorganismos, pelo apoio mútuo.

A todos os meus amigos que entendem que muitas vezes não posso estar presente. Aos meus amigos da graduação, em especial ao Fernando, Natália e Cláudia, por terem passado tantos bons momentos comigo!

Aos meus pais, Joaquim e Fátima, meu irmão André, e ao Thiago pelo exemplo de vida, carinho, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida. Agradeço também a toda a minha família, vovó Noeme, tios, tias, primos e primas, que são muito importantes para mim.

Ao IBAMA, principalmente ao Junio, Daniel e Diego, pela coleta e disponibilização de material para o estudo.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

**“A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência.”**

Charles Darwin

## RESUMO

A família *Psittacidae* é considerada uma das famílias de aves mais ameaçadas do mundo, devido a atividades antrópicas como a destruição do habitat natural e captura para a venda como animais de estimação. No Brasil, a espécie *Amazona aestiva* é uma das aves mais capturadas em seu habitat natural para abastecer o tráfico de animais silvestres. O comércio legalizado é uma alternativa para se evitar o declínio das populações selvagens, entretanto o crescente número de criadouros legalizados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), gera a necessidade de novas formas de fiscalização deste comércio para se evitar fraudes. O isolamento de marcadores moleculares para esta ave é fundamental para o desenvolvimento do teste de paternidade, que possibilita verificar se os exemplares comercializados têm origem em cativeiro, sendo sua venda legalizada, ou são silvestres, com venda ilegal. O objetivo desse trabalho foi o isolamento de regiões de microssatélites de *A. aestiva* para o posterior desenvolvimento do teste de paternidade. Para isso foi construída uma biblioteca genômica primária para essa espécie, que foi hibridizada com sondas de diversas sequências repetitivas marcadas radioativamente. Estima-se que 2,5% dos clones da biblioteca possuam microssatélites. Após sequenciamento de 83 clones positivos, foram escolhidos os 4 maiores *loci* de microssatélites encontrados, que possuíam repetições de tema de tetranucleotídeos a hexanucleotídeos, para o desenho de 2 pares de iniciadores para a realização de *Nested PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). Além disso, as sequências obtidas por este trabalho foram comparadas com outras sequências depositadas em bancos de dados. O resultado do *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) indicou que 32% das sequências tiveram similaridade com outras sequências de aves, incluindo Psittaciformes, apenas 7% possuía similaridade com outros organismos e 61% das sequências não possuíam similaridade com nenhuma sequência conhecida, revelando o pouco conhecimento que há sobre o genoma dessa espécie. Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitarão a verificação de polimorfismo nos microssatélites encontrados e espera-se que eles possam ser utilizados para o teste de paternidade e uma série de outros estudos da biologia desta ave que são importantes para a conservação da mesma.

## ABSTRACT

The *Psittacidae* family is considered to be one of the most endangered avian families in the world. The major threats include human activities such as habitat destruction and capture for resale as pets. In Brazil, the species *Amazona aestiva* is one of the most captured parrots used to supply the illegal wildlife trade. Legalized trade is an alternative to avoid a decline of wild populations. However, since legal breeding, authorized by IBAMA - *Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis* (Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources), has been increasing, new manners of surveillance for such trade are needed to prevent fraud. The isolation of molecular markers for this type of parrot is fundamental to the development of paternity testing. This method allows the source of the animals to be checked, i.e. captivity or the wild. The objective of this study was to isolate microsatellite of *A. aestiva* for paternity testing development. Thus we constructed a primary genomic DNA library for this species, which was hybridized with radioactively labeled probes of various repetitive sequences. About 2.5% of the library clones had microsatellites. After sequencing 83 positive clones, the 4 largest microsatellite *loci* were selected in order to design 2 pairs of primers to perform Nested PCR (Polymerase Chain Reaction). The *loci* had repetitions of tetranucleotide to hexanucleotide themes. In addition, the sequences obtained in this project were compared with others deposited in databases. The BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) results indicated that 32% of the sequences had similarities to sequences of avians, only 7% were similar to other organisms and 61% had no similarity to any known sequence, revealing that knowledge about the genome of this species is scarce. In future studies we intend to verify the polymorphism in the microsatellites found in this project and use them for paternity testing and additional research on parrot biology that is important to species conservation.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

FIGURA 1 - Papagaios da espécie <i>A. aestiva</i> .....	14
FIGURA 2 - Distribuição geográfica da espécie <i>A. aestiva</i> .....	16
GRÁFICO 1 - Recebimento de <i>A. aestiva</i> pelo IBAMA de Belo Horizonte.....	18
FIGURA 3 - Deslizamento da enzima DNA Polimerase durante a replicação do DNA.....	22
FIGURA 4 - Vetor <i>pCR4Blunt-TOPO</i> utilizado na biblioteca genômica de <i>A. aestiva</i> .....	31
FIGURA 5 - Molde para aplicação dos clones nas membranas de nylon. ....	38
FIGURA 6 - Obtenção dos fragmentos de DNA genômico de <i>A. aestiva</i> .....	41
FIGURA 7 - Seleção de colônias pelo sistema IPTG/X-gal. ....	42
FIGURA 8 - Verificação do tamanho dos fragmentos da biblioteca genômica. ....	43
FIGURA 9 - Auto-radiografia de hibridização com sonda radioativa da membrana 2.....	44
GRÁFICO 2 - Distribuição dos microssatélites quanto ao número de bases de suas repetições. ....	45
FIGURA 10 - Eletroferogramas mostrando trechos de microssatélites. ....	46
GRÁFICO 3 - Resultado de similaridade das sequências no programa BLAST.....	46

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 Descrição de <i>loci</i> polimórficos em <i>A. aestiva</i> obtidos através de amplificação heterológica. .....	24
TABELA 2 Seqüências das sondas de oligonucleotídeos de 16 pb marcadas com [ $\gamma$ 32P] ATP radiativo usadas na busca de clones com microssatélites .....	39
TABELA 3 <i>Loc</i> i de microssatélites com seus pares de iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento e tamanho do amplicon.....	48
TABELA 4 Clones que possuem similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados <i>on- line</i> .....	61

**ABREVIATURAS E SIGLAS**

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

ATP - Adenosina trifosfato

°C - Graus celsius

CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres

cm - Centímetro

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

g - Grama

h - Hora

HCl - Ácido clorídrico

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IPTG - Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

kV - Quilovolt

LB - Meio Luria Bertani para cultura de bactérias

M - Molar

mA - Mili Ampere

mCi - Milicurie

mg - Miligrama

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

min - Minuto

ml - Mililitro

mM - Milimolar

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ng - Nanograma

NaCl - Cloreto de sódio

P - Fósforo

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomol

PVC - Poli cloreto de vinila

psi - Libra por polegada ao quadrado

q.s.p. - Quantidade suficiente para

RFLP - Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição

RNA - Ácido ribonucléico

r.p.m - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

seg - Segundo

SSR - Sequência simples repetida

STR - Repetição de sequências em *tandem*

TAE - Tris, ácido acético, EDTA

Taq DNA polimerase - DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

TE - Tris, EDTA

TEN9 - Tris-HCl, EDTA, NaCl, pH 9

U - Unidade de enzima

V - Volts

X-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo

μg - Micrograma

μl - Microlitro

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	14
1.1 - O papagaio <i>Amazona aestiva</i> .....	14
1.2 - Marcadores Moleculares.....	19
1.3 - Os Microsatélites.....	20
1.4 - Estudos de microsatélites em psitacídeos .....	23
1.5 - Justificativa .....	25
2 - OBJETIVO .....	26
2.1 - Objetivos específicos .....	26
3 - MATERIAIS .....	27
3.1 - Equipamentos.....	27
3.2 - Reagentes .....	28
3.2.1 - Antibióticos .....	28
3.2.2 - Meios de cultura .....	28
3.2.3 - Soluções.....	29
3.3 - Linhagem de bactéria hospedeira .....	30
3.4 - Espécime de <i>Amazona aestiva</i> .....	30
3.5 - Kits utilizados.....	30
3.6 - Vetor de clonagem.....	31
3.7 - Iniciadores M13 para PCR .....	32
4 - MÉTODOS .....	33
4.1 - Extração do DNA Genômico de <i>A. aestiva</i> .....	33
4.2 - Fragmentação do DNA Genômico de <i>A. aestiva</i> .....	33
4.3 - Purificação dos fragmentos de DNA de <i>A. aestiva</i> .....	34
4.4 - Preparo dos fragmentos de DNA de <i>A. aestiva</i> para a ligação ao vetor de clonagem .....	35
4.5 - Construção do DNA recombinante .....	35
4.6 - Transformação de bactérias e seleção dos clones recombinantes.....	36
4.7 - Purificação dos plasmídeos recombinantes.....	37
4.8 - Identificação dos clones com microsatélites de interesse.....	37
4.9 - Sequenciamento dos clones com microsatélites.....	39

4.10 - Análise do sequenciamento e desenho dos iniciadores .....	40
5 - RESULTADOS .....	41
5.1 - Obtenção dos fragmentos de DNA genômico de <i>A. aestiva</i> .....	41
5.2 - Construção da Biblioteca genômica de <i>A. aestiva</i> .....	42
5.3 - Identificação e caracterização de microssatélites nos clones da biblioteca genômica de <i>A. aestiva</i> .....	44
5.4 - Desenho de iniciadores para Nested PCR.....	47
6 - DISCUSSÃO.....	49
6.1 - Perspectivas .....	52
7 - CONCLUSÃO .....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
APÊNDICE A - Resultado da busca por similaridade em bancos de dados <i>on-line</i> utilizando o programa BLAST .....	61

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - O papagaio *Amazona aestiva*

A espécie *Amazona aestiva* (Linnaeus, 1758) é conhecida popularmente como papagaio verdadeiro, papagaio de frente azul, papagaio comum, entre outros nomes (Sick, 1988). Esta ave atinge aproximadamente 35 cm, e pesa cerca de 400 g. Possui bico alto e recurvado, apresenta cauda curta e a maior parte do corpo é coberta de penas verdes. Na cabeça, observa-se a frente azul e penas amarelas ao redor dos olhos. A parte superior das asas e base da cauda possui penas vermelhas (Sick, 1988). Essa espécie possui grande diversidade individual no colorido, sendo que as áreas azuis e amarelas da cabeça variam muito de tamanho, independente do sexo. Desta forma não se encontram dois indivíduos iguais (Sick, 1988) (**FIG. 1**).



**FIGURA 1 - Papagaios da espécie *A. aestiva*.**

Viveiro do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Belo Horizonte. Vários exemplares de *A. aestiva*. Observa-se a grande diversidade individual no colorido das penas na região da cabeça. Foto: Diêgo Maximiano.

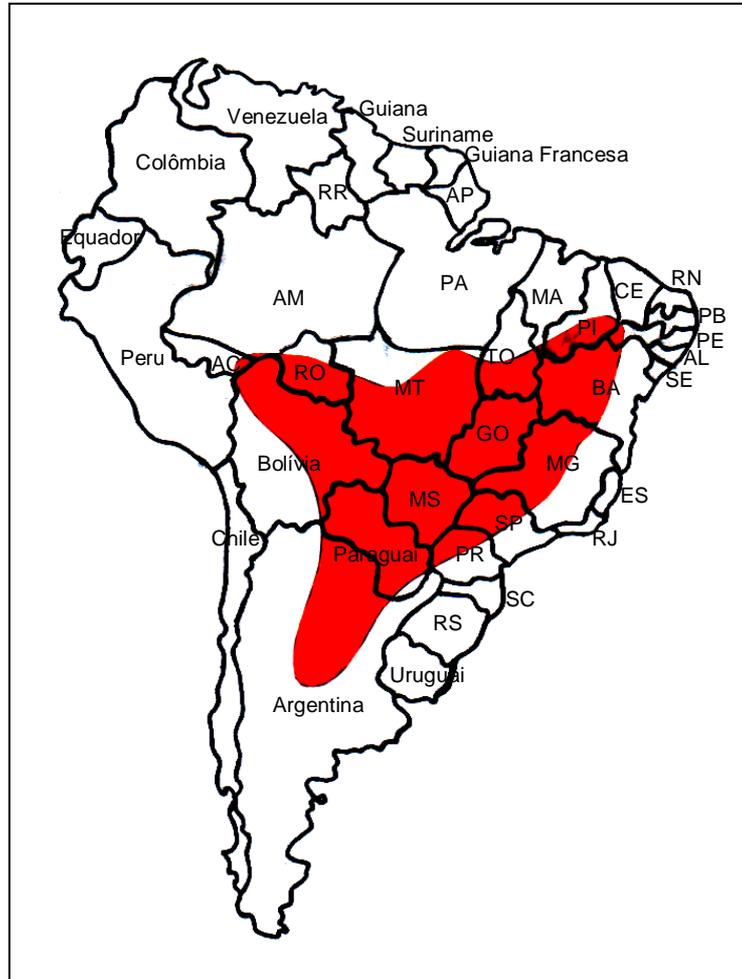
Esta espécie pertence à ordem *Psittaciformes*, família *Psittacidae*. Essa ordem é de origem antiga, com fósseis datados em 25 milhões de anos encontrados na França e Estados Unidos e em 20 milhões de anos no Brasil. Atualmente, possuem ampla distribuição pela zona tropical do globo como Oceania, África e América, onde se irradiam para áreas subtropicais e frias como a Patagônia (Sick, 1988). A sistemática dessa ordem é ainda pouco esclarecida, mas já foi comprovada uma nítida separação entre as espécies do Velho Mundo e do Novo Mundo (Sick, 1988).

O Brasil é o país com maior número de espécies de *Psittacidae* no mundo, com 72 espécies ocorrendo em seu território, do total de 344 espécies. Esse fato foi evidenciado pelos primeiros colonizadores, de 1500 em diante, sendo o país designado como “Terra dos Papagaios” (*Brasília sive terra papagallorum*) (Sick, 1988).

Esta ave vive em matas (úmidas ou secas), palmais e beiras de rios. No Brasil, ocorre em alguns estados da região Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, exceto nas regiões litorâneas (Sick, 1988). Também ocorre em outros países como Paraguai, Argentina e Bolívia (**FIG. 2**). A espécie *A. aestiva* é monogâmica e geralmente é vista em bandos, nos quais é possível notar casais pareados (Seixas e Mourão, 2000). Atingem maturidade reprodutiva no terceiro ou quarto ano de vida e a nidificação ocorre em árvores vivas ou mortas, encontradas em diversos ambientes como pastos, savanas abertas, manchas de florestas ou áreas alagadas (Seixas e Mourão, 2002). O período reprodutivo ocorre apenas uma vez por ano, a partir do mês de setembro, normalmente com uma postura de quatro ovos por ninhada. Os ovos são chocados pela fêmea durante 24 a 29 dias, gerando um a três filhotes por ano. Os filhotes necessitam de cuidado parental até adquirirem capacidade de vôo e saírem do ninho, o que ocorre dois meses após o nascimento (Sick, 1988).

A família *Psittacidae* é considerada uma das famílias de pássaros mais ameaçadas do mundo (Bennett e Owens, 1997). As principais ameaças sofridas por essa espécie são as atividades antrópicas, como a destruição de seu habitat natural e sua captura em ambientes silvestres para serem vendidos como animais de estimação por traficantes de animais (Collar e Juniper, 1992). A frequente derrubada de árvores em seu habitat elimina locais favoráveis à reprodução, pois essa espécie

nidifica em troncos ocos e também pode provocar a falta de comida decorrente da eliminação de árvores frutíferas utilizadas para alimentação desta ave (Sick, 1988).



**FIGURA 2 - Distribuição geográfica da espécie *A. aestiva*.** Região em vermelho representa a distribuição geográfica de *A. aestiva*. Observa-se que esta espécie está distribuída no centro da América do Sul em países como o Brasil, Paraguai, Argentina e Bolívia. Fonte: Sigrist, 2007 com modificações.

Por ter grande capacidade de imitar a fala humana, é costume no Brasil e em outros países do exterior possuir papagaios como animais de estimação. Devido à excessiva retirada desses animais do ambiente silvestre, já foi observado que muitas espécies desapareceram de centros urbanos mais populosos (Sick, 1988).

No Brasil, a captura de animais silvestres é proibida desde a Lei nº 5.197 de 03 de janeiro de 1967, na qual se lê:

“Os animais de quaisquer espécies, em qualquer fase de seu desenvolvimento e que vivem naturalmente fora do cativeiro, constituindo a fauna silvestre, bem como seus ninhos, abrigos e criadouros naturais são propriedades do Estado, sendo proibida a

sua utilização, perseguição, destruição, caça ou apanha (Lei nº 5.197 de 03 de janeiro de 1967, art. 1º).”

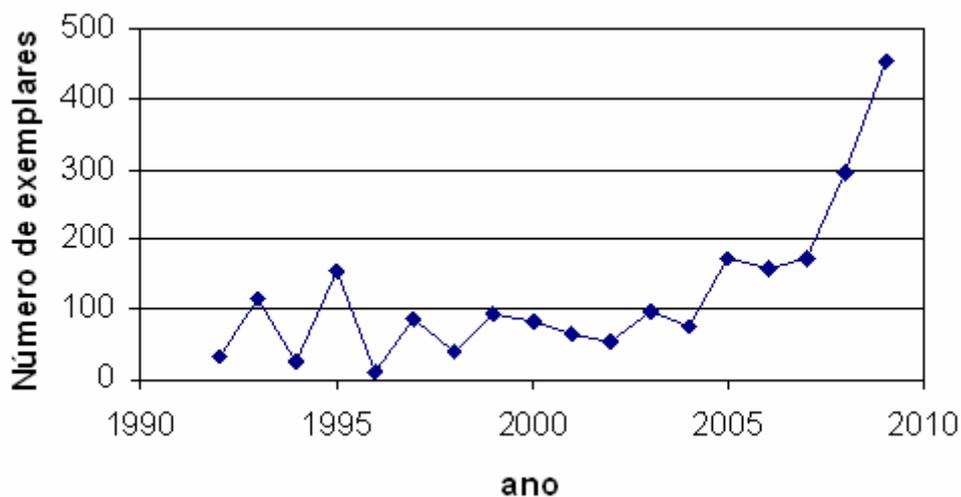
Somente é permitida a venda de animais nascidos em cativeiro provenientes de criadouros legalizados. Atualmente existem centenas de criadouros legalizados registrados no Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA (IBAMA, 2006). Antes de serem comercializados, os animais nascidos em cativeiro são marcados com anilhas ou microchips, para distingui-los dos animais ilegais, mas mesmo essas marcações não são livres de fraudes e adulterações.

Apesar da legislação, o comércio ilegal de animais silvestres é uma prática disseminada por todo o Brasil, porém são poucas as estatísticas disponíveis sobre o tema (Longatto e Seixas, 2004), existindo apenas alguns levantamentos pontuais sobre o tráfico ilegal de psitacídeos no Brasil. No período de 1988 a 1998 foram apreendidos 1.853 indivíduos de *A. aestiva*, 31 de *Amazona amazônica*, 25 de *Amazona xanthops* e 1 de *Amazona farinosa*, em operações efetuadas pelas autoridades do Estado de Mato Grosso do Sul (Seixas e Mourão, 2000). Pinho e Nogueira (2000) observaram que *A. aestiva* foi o psitacídeo com maior ocorrência como animal de estimação nas residências de Cuiabá entre 1995 a 1997. Neste mesmo período, esses autores analisaram as doações de animais silvestres ao Zoológico da Universidade Federal de Mato Grosso. Foram doados 72 indivíduos de 11 espécies de psitacídeos e *A. aestiva* foi a espécie mais frequente nestas doações.

Longatto e Seixas (2004) analisaram registros documentais de animais silvestres apreendidos pelo 15º Batalhão da Polícia Militar Ambiental do estado de Mato Grosso do Sul, referentes aos anos de 1999 a 2002. Obtiveram um total de 121 espécies registradas pela fiscalização, sendo que a maior ocorrência foi de aves, com 2.463 indivíduos de 76 espécies, totalizando 60,5% dos registros. As espécies mais frequentes entre as aves foram os papagaios (*A. aestiva*, *A. xanthops* e *A. amazônica*), canários, periquitos, curiós e araras. Foram apreendidos 439 papagaios, totalizando 10,8% das apreensões. Além disso, eles verificaram que *A. aestiva* foi a espécie mais frequente no cadastro voluntário de animais mantidos em cativeiro, realizados nos municípios de Três Lagoas (1997) e Dourados (1999 e 2000) com, respectivamente, 497 (74,4%) e 538 (86,5%) indivíduos.

Segundo Rocha e colaboradores (2006), em Campina Grande, Paraíba, psitacídeos são comercializados por meio de encomendas, já que estes animais são capturados em outras regiões do Brasil, como na região Centro-Oeste. De acordo com os vendedores, são muitos os pedidos feitos, principalmente para exemplares de *A. aestiva*, vendidos por preços que variam de R\$ 30,00 a 200,00 reais.

O IBAMA de Belo Horizonte mantém registro do recebimento, ou seja apreensões, doações ou recolhimentos de *A. aestiva*, no período de 1992 até setembro de 2009 (informação verbal)<sup>1</sup>. Nestes dados, observa-se que o recebimento era irregular no período de 1992 até 1999, com anos em que foram recebidos menos de 40 exemplares seguidos por outros anos com recebimentos de quantidades maiores que 80 exemplares. Após 1999, período em que foram recebidos 92 indivíduos, houve uma diminuição gradual neste número, até 2002, ano em que foram apreendidos 52 indivíduos. Entretanto, a partir de 2002 houve um intenso crescimento no número de recolhimentos, chegando a atingir 453 exemplares no ano de 2009, sendo que os dados foram coletados até setembro deste mesmo ano (**GRÁF. 1**). Segundo a mesma fonte, o aumento no número de recebimentos provavelmente ocorreu devido a uma maior fiscalização.



**GRÁFICO 1 - Recebimento de *A. aestiva* pelo IBAMA de Belo Horizonte.** Percebe-se um intenso crescimento no número de recolhimentos no período de 2002 até setembro de 2009, devido provavelmente ao aumento da fiscalização. Fonte: IBAMA (informação verbal)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Msc. Daniel Ambrósio da Rocha Vilela, Médico Veterinário, Analista Ambiental, responsável pelo CETAS/IBAMA de Minas Gerais.

Sendo assim, vários registros mostram que anualmente muitos exemplares desta ave são retirados de seu habitat natural para sua venda como animais domésticos.

As ações antrópicas podem colocar em risco espécies do gênero *Amazona*, mesmo as que são amplamente distribuídas e habitam regiões ainda pouco impactadas (Galetti *et al*, 2002). A preservação dessas espécies deve ser interesse de agências de fomento envolvidas em projetos de conservação de espécies, já que é mais barato impedir que uma espécie não ameaçada torne-se vulnerável do que tirar uma espécie de qualquer categoria de ameaça da lista de animais em risco de extinção (Galetti *et al*, 2002).

Uma ferramenta que auxilia na preservação de espécies, principalmente as visadas pelo tráfico ou caça de animais silvestres, é o isolamento e caracterização de microssatélites, um tipo de marcador molecular utilizado em testes genéticos. Esses marcadores podem ser utilizados para análises forenses, em investigações relacionadas a crimes ambientais.

## 1.2 - Marcadores Moleculares

O surgimento da biologia molecular introduziu vários tipos de marcadores que se tornaram usuais para diversos tipos de estudos biológicos como mapeamento gênico, reconstruções filogenéticas e testes de paternidade (Schlotterer, 2004).

O primeiro grupo de marcadores moleculares a ser estabelecido foram as alozimas (variantes alélicas para enzimas), cujo princípio básico era que os variantes alélicos podiam ser diferenciados dos nativos em eletroforese, devido a diferenças no tamanho e carga causados pela substituição de aminoácidos. Todavia o número de *loci* informativos era pequeno e na verdade esse método era uma forma indireta de detectar variações genéticas (Schlotterer, 2004).

Após a descoberta das enzimas de restrição, surgiu uma nova classe de marcadores genéticos, o polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) que consiste em substituição de bases em sítios de reconhecimento de enzimas de restrição que mudam o padrão de clivagem dos fragmentos (Schlotterer, 2004).

Em seguida, os minissatélites surgiram como um conceito novo de marcador. Eles consistem em repetições em *tandem* que frequentemente mostram polimorfismos de comprimento que surgem devido a recombinação de cromossomos homólogos. A hibridização das sequências de minissatélites com sondas produz um padrão em código de barras, o que possibilita a identificação individual e testes de paternidade (Schlotterer, 2004). Após o desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) foram descobertos os microssatélites, que são similares aos minissatélites, porém possuem temas de repetições menores. Eles são altamente polimórficos, abundantes e amplamente distribuídos pelo genoma. Atualmente eles são um dos marcadores moleculares mais usuais para estudos genéticos (Schlotterer, 2004).

### 1.3 - Os Microssatélites

Também conhecidos como sequências simples repetidas (*Simple sequence repeats*, SSR) ou repetições de sequências em *tandem* (*simple tandem repeats*, STR), os microssatélites são pequenos segmentos de DNA com repetições de um tema específico de 2 a 6 pares de bases amplamente distribuídos por todo o genoma (Goldstein e Pollock, 1997). As repetições dos microssatélites mais frequentes são os di, tri e tetranucleotídeos, enquanto que penta e hexanucleotídeos são mais raros (Ellegren, 2004). Eles são encontrados em todos os genomas de procariotos e eucariotos estudados e podem estar presentes em regiões codificantes e não codificantes, mas usualmente são encontrados em regiões não codificantes (Zane *et al.*, 2002).

Normalmente esse marcador possui alto grau de polimorfismo, e não são raros os estudos em que se encontram mais de 10 alelos em amostragens relativamente pequenas (Caparroz *et al.*, 2003; Sainsbury *et al.*, 2004; Taylor e Parkin, 2007a). Geralmente, quanto maior o número de repetições, maior é a taxa de mutação e, provavelmente, maior o polimorfismo do *locus* (Schlotterer, 2000). Mas para cada novo grupo taxonômico estudado, novos microssatélites precisam ser isolados a partir de bibliotecas genômicas parciais, tarefa que demanda grande quantidade de tempo e de recursos (Zane *et al.*, 2002). Entretanto, alguns estudos

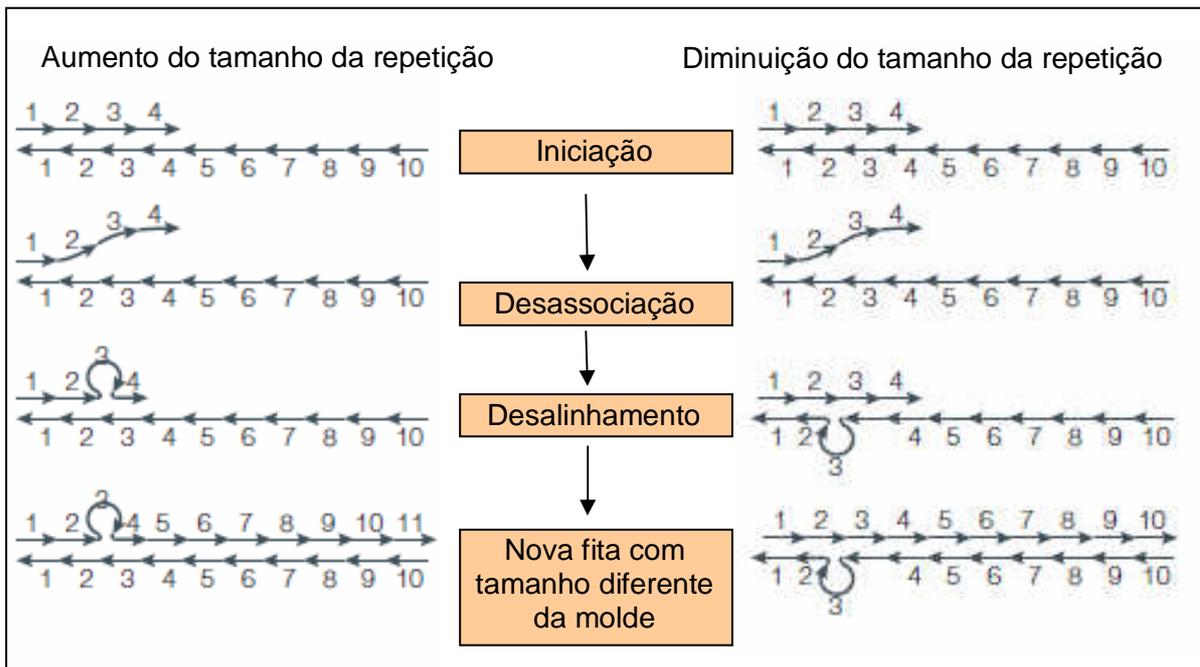
mostram que pode ocorrer amplificação heteróloga entre espécies filogeneticamente próximas. Primmer e colaboradores (1996) testaram a possibilidade de amplificação heteróloga de microssatélites utilizando iniciadores elaborados para as espécies *Hirundo rústica* e *Ficedula hypoleuca* em 48 espécies de diferentes gêneros de aves. Eles concluíram que há uma relação negativa significativa entre amplificação do *loci* de microssatélite e a distância evolucionária entre as espécies originais e as testadas.

Os microssatélites usualmente são considerados marcadores de evolução neutra, mas vários estudos vêm relacionando alguns microssatélites com funções como a organização do cromossomo e do centrômero, recombinação entre cromossomos homólogos, replicação do DNA, ciclo celular e transcrição e tradução gênica (Li *et al.*, 2002).

Microssatélites possuem uma das maiores taxas de mutação observadas em marcadores moleculares (Goldstein e Pollock, 1997). Ainda há debates sobre o que causa essa alta taxa de mutação, mas a explicação mais aceita para sua ocorrência é o deslizamento da enzima DNA Polimerase durante a replicação do DNA (*replication slippage*) (Zane *et al.*, 2002). Em regiões repetitivas, durante a replicação do DNA, pode ocorrer um desalinhamento das duas fitas, levando a formação de alças em uma das fitas, o que ocasionará uma inserção ou deleção de unidades de repetições (Ellegren, 2004) (**FIG. 3**).

A maioria das mutações observadas é de apenas um passo (*single step*) com a adição ou deleção de uma repetição, podendo ocorrer mutações maiores em frequência muito inferior (Anmarkrud *et al.*, 2008). Há uma tendência de mutações que aumentam os alelos (assimetria positiva). Entretanto, sequências muito grandes de microssatélites não parecem ser estáveis (Anmarkrud *et al.*, 2008), tanto que *loci* com mais de 60 repetições são raramente observados. Isso ocorre provavelmente porque microssatélites longos são degradados por grandes deleções ou interrompidos pela introdução de imperfeições (Goldstein e Pollock, 1997). Aparentemente há um equilíbrio entre o tamanho e pontos de mutação que quebram repetições muito longas em pequenas unidades (Ellegren, 2004).

Uma das vantagens dos microssatélites é que eles possibilitam estudos não invasivos, porque utilizam a técnica de PCR que necessita de pequenas quantidades de material para a extração de DNA (Miyaki e Eberhard, 2002).



**FIGURA 3 - Deslizamento da enzima DNA Polimerase durante a replicação do DNA.**

Durante a replicação do DNA, as duas fitas podem se desassociar e realinhar de maneira incorreta. Se uma alça se forma na fita molde, a fita nascente terá um número maior de repetições. Se a alça se forma na fita nascente, esta terá um número menor de repetições. Fonte: Ellegren, 2004.

Devido ao seu alto grau de polimorfismo, os microssatélites são usados em diversos tipos de estudos, como análise forense de DNA, genética de população, conservação e manejo de recursos biológicos (Zane *et al.*, 2002), estudos de ligação e de mapeamento gênico e reconstruções filogenéticas (Schlotterer, 2004). Na área forense, em investigações de crimes ambientais, os microssatélites podem ser utilizados em diversas análises, como a identificação da espécie do animal em apreensões de contrabando de corpos ou ossos de animais silvestres (Singh, *et al.*, 2004; Xu, *et al.*, 2005), caça ilegal (Poetsch, *et al.*, 2001; Gupta, *et al.*, 2005; Lorenzini, 2005). Esses marcadores podem até mesmo serem usados para identificar a qual população pertence um determinado animal ou se ele é de origem silvestre ou de cativeiro (Manel *et al.*, 2002; Renshaw, *et al.*, 2006).

Para melhor resultado da amplificação dos microssatélites, pode ser utilizada uma modificação da PCR tradicional conhecida como *Nested PCR*. Na *Nested PCR* são feitos dois ciclos de amplificações. No primeiro ciclo utiliza-se um determinado par de iniciadores e os amplicons gerados são utilizados como molde para o segundo ciclo com iniciadores mais internos em relação aos primeiros. Assim, as bandas inespecíficas formadas no primeiro ciclo dificilmente terão uma região

complementar ao segundo par de iniciadores, e desta forma apenas a região de interesse terá a segunda amplificação, aumentando a especificidade e a eficiência da reação (Strom e Rechitsky, 1998; Lagoa et. al, 2008).

#### 1.4 - Estudos de microssatélites em psitacídeos

A família *Psittacidae* é uma das famílias de aves mais ameaçadas do mundo, e apesar de possuir mais de 300 espécies, ainda há poucos estudos de isolamento de microssatélites para este grupo. O primeiro trabalho que envolveu microssatélites em psitacídeos foi a produção de biblioteca genômica parcial de *Forbus passerinus* (Hughes et al., 1998), uma ave da América Latina e Central. Outros trabalhos para psitacídeos das Américas foram para *Amazona guildingi* (Russello et al., 2001; Russello et al., 2005), *Ara ararauna* (Caparroz et al., 2003) e *Amazona leucocephala* (Taylor e Parkin, 2007b). Em espécies de psitacídeos africanos foi realizado um estudo para *Psittacus erithacus* (Taylor e Parkin, 2007a). Para psitacídeos da Oceania, foram realizados estudos para as espécies *Strigops habroptilus* (Robertson et al., 2000), *Nestor meridionalis* (Sainsbury et al., 2004), *Cyanoramphus forbesi* (Chan et al., 2005) e *Cacatua moluccensis* (Taylor e Parkin, 2007b). Outros trabalhos não isolaram novos microssatélites, mas testaram a possibilidade de amplificação heteróloga de iniciadores descritos para espécies filogeneticamente relacionadas (Caparroz et al., 2007; Gebhardt e Waits, 2008). Para a espécie *A. aestiva* não há estudos específicos de construção de biblioteca e isolamento de microssatélites, mas alguns iniciadores descritos para *A. guildingii* (Russello et al., 2001 e Russello et al., 2005) e *Ara ararauna* (Caparroz et al., 2003) foram bem sucedidos na amplificação heteróloga de *loci* de microssatélites nesta espécie (Caparroz et al., 2007), conforme descrito na **TABELA 1**.

Utilizando esses *loci* polimórficos, Leite e colaboradores (2008) realizaram um estudo populacional com 74 indivíduos de *A. aestiva* de cinco populações diferentes, sendo quatro populações em território brasileiro (Tocantins, Brasília, Chapada Gaúcha, Pantanal Sul Mato-grossense) e uma na Argentina (Província del Chaco). Como a população selvagem de *A. aestiva* vem diminuindo devido à atividade

TABELA 1

Descrição de *loci* polimórficos em *A. aestiva* obtidos através de amplificação heterológica.

Nome e número de acesso no <i>GenBank</i>	Tema da repetição	iniciadores	Temperatura de anelamento <sup>4</sup>	Nº de alelos <sup>4</sup>	Tamanho do amplicon <sup>4</sup>
<b>AgGT04<sup>1</sup></b> (AF339755)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' CTTGCTCCACTGAAGG 3' R: 5' GCGATGAAGATAACCC 3'	48 °C	4	254-262 pb
<b>AgGT07<sup>1</sup></b> (AF339756)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' CAAACCATTTACACCC 3' R: 5' GCTCTTGAGTTTTCCC 3'	50 °C	12	257-283 pb
<b>AgGT12<sup>1</sup></b> (AF339758)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' ACTCATGCAGGGGTTCTCAG 3' R: 5' TTGTGGCTGGTAGAGGTGTG 3'	58 a 50 °C	15	299-333 pb
<b>AgGT21<sup>1</sup></b> (AF339760)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' TCCCAGGCCAACACATTTAC 3' R: 5' GCTTAGTGCATATCCCAAGCTA 3'	50 °C	16	306-340 pb
<b>AgGT22<sup>3</sup></b> (AY878249)	(CA) <sub>n</sub>	F: 5' CCTGGATGTGCTCTGTGATG 3' R: 5' GGAGCACCATAGCTTGAGGA 3'	59 °C	5	190-198 pb
<b>AgGT29<sup>3</sup></b> (AY878250)	(CA) <sub>n</sub>	F: 5' CATGATGGGTTGGCTTTTTTC 3' R: 5' CTGCAAGCATGCATGAGAAC 3'	59 °C	12	190-224 pb
<b>AgGT72<sup>3</sup></b> (AY878253)	(CA) <sub>n</sub>	F: 5' GTCATATGATTGTTGCTAATCAGTG 3' R: 5' AGAACAGCCTTATGGAAAGTTG 3'	50 °C	14	270-302 pb
<b>AgGT81<sup>1</sup></b> (AF339761)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' GGGGAACATCATTCTTCCAG 3' R: 5' AGAAGGAGGGAAGCACATGA 3'	50 °C	5	332-344 pb
<b>AgGT83<sup>1</sup></b> (AF339762)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' GGCCTGGGTAACAAAAAGGT 3' R: 5' ACCTAAGAGGCCATCCCAGT 3'	58 a 50 °C	17	231-275 pb
<b>AgGT90<sup>3</sup></b> (AY878255)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' TCCACAATTCTACCGAAGTGG 3' R: 5' ACAGACACATCACTCCCCAAC 3'	58 a 50 °C	13	196-232 pb
<b>UnaCT43<sup>2</sup></b> (AYZ44486)	(GT) <sub>n</sub>	F: 5' TCATCCTATCACCAGAAGGG 3' R: 5' CTTGAGGACAGTGCAGAGGG 3'	52 °C	6	199-211 pb

<sup>1</sup> Russello *et al.* (2001); <sup>2</sup> Caparroz *et al.* (2003); <sup>3</sup> Russello *et al.* (2005); <sup>4</sup> Caparroz *et al.* (2007)

antrópica que causa rápida e intensa fragmentação e destruição do habitat e sua captura para tráfico de animais silvestres (Collar e Juniper, 1992), esse trabalho visou verificar se esta diminuição no número de indivíduos selvagens provocou um recente efeito gargalo nas populações dessa espécie. Uma significativa diferenciação genética só foi detectada entre as populações do Tocantins e da Argentina, que eram as duas localidades mais distantes. Aparentemente ainda há fluxo gênico entre as demais populações estudadas e o efeito gargalo não foi confirmado. Entretanto, *A. aestiva* tem uma longa expectativa de vida, de aproximadamente 70 anos e a fragmentação do habitat e a atividade mais intensa do tráfico é recente, de aproximadamente 60 anos. Possivelmente, alguns dos indivíduos utilizados no estudo são anteriores aos grandes distúrbios antrópicos, sendo assim, os efeitos desses impactos podem ainda não ter afetado a estrutura genética e a diversidade dessa espécie (Leite *et al.*, 2008).

### **1.5 - Justificativa**

*A. aestiva* é uma das espécies de aves mais retirada do habitat natural para venda como animal de estimação. O comércio legalizado é uma alternativa para evitar o declínio das populações selvagens, mas o crescente número de criadouros legalizados pelo IBAMA cria a necessidade de novas formas de fiscalização deste comércio para impedir fraudes. O isolamento de marcadores moleculares para esta ave é fundamental para a criação de um teste de paternidade. Com este teste será possível verificar se os exemplares comercializados têm origem em cativeiro, sendo sua venda legalizada, ou são silvestres, com venda ilegal. Além disso, esses microssatélites permitirão uma série de estudos da biologia desta ave, que serão importantes para sua conservação, visto que mesmo sendo uma espécie que sofre grande impacto das atividades humanas, estudos sobre a sua biologia ainda são incipientes.

## 2 - OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi o isolamento de marcadores moleculares para a ave *A. aestiva*.

### 2.1 - Objetivos específicos

1. Construção de biblioteca genômica primária de *A. aestiva*.
2. Triagem de clones com marcadores moleculares utilizando sondas radioativas.
3. Sequenciamento de clones positivos encontrados pela triagem da biblioteca genômica.
4. Elaboração de iniciadores para as regiões com marcadores moleculares.
5. Verificação de similaridade das sequências geradas com sequências depositadas em bancos de dados *on-line*.

### 3 - MATERIAIS

#### 3.1 - Equipamentos

- ✓ Agitador magnético de soluções – *Sigma*
- ✓ Autoclave vertical – *Phoenix*
- ✓ Câmara de incubação B.O.D. - *Fanem*
- ✓ Balança analítica - *Ohaus Standart*
- ✓ Banho-maria - *Fisher Scientific*
- ✓ Capela química - *Quimis*
- ✓ *Ultraviolet Crosslinker* - *UVP*
- ✓ Cubas para eletroforese - *Owl*
- ✓ Eletroporador Micropulser - *BioRad*
- ✓ Capela de Fluxo laminar - *Veco*
- ✓ Fontes para eletroforese - *Life Technologies*
- ✓ Forno de microondas - *Philco*
- ✓ Freezer -20°C - *Consul*
- ✓ Geladeira - *Consul*
- ✓ Medidor de pH - *Hanna*
- ✓ Microcentrífuga de mesa refrigerada 5415 R - *Eppendorf Research*
- ✓ Nebulizador - *Invitrogen*
- ✓ Pipetadas de volume ajustável - *Eppendorf Research*
- ✓ Pistilo de porcelana
- ✓ Seqüenciador automático ABI 3130 – *Applied Biosystems*
- ✓ *Shaker* Incubador - *New Brunswick Scientific*
- ✓ Tanque de nitrogênio
- ✓ termociclador *Mastercycle* - *Eppendorf Research*
- ✓ Transiluminador - *Bio-Rad*

## **3.2 - Reagentes**

### **3.2.1 - Antibióticos**

Os antibióticos foram dissolvidos em água destilada estéril na concentração e filtrados em ambiente estéril e estocados a -20°C.

#### **Ampicilina**

Concentração final de uso de 100 µg/ml.

#### **Canamicina**

Concentração final de uso de 100 µg/ml.

### **3.2.2 - Meios de cultura**

#### **LB Ágar**

100 mM NaCl, 1% Peptona, 0,5% Extrato de levedura, 1,5% Agar. Dissolver em água destilada e ajustar pH para 7,5. Autoclavar.

#### **LB caldo**

100 mM NaCl, 1% Peptona, 0,5% Extrato de levedura. Dissolver em água destilada e ajustar pH para 7,5. Autoclavar.

#### **SOC**

2% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glicose. Dissolver em água destilada e ajustar pH para 7,5. Autoclavar.

### **3.2.3 - Soluções**

#### **Gel de Agarose**

0,8%, 1,0% ou 1,5% de agarose de acordo com a porcentagem do gel a ser preparado. Dissolver a agarose por aquecimento em TAE.

#### **Solução I para precipitação de plasmídeo por lise alcalina**

50 mM Glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0. Diluir em água destilada.

#### **solução II para Precipitação de plasmídeo por lise alcalina**

200 mM NaOH, 1% SDS. Diluir em água destilada.

#### **solução III para Precipitação de plasmídeo por lise alcalina**

3 M Acetato de potássio, 11,5% ácido acético glacial. Diluir em água destilada.

#### **Solução BLOTO**

5% Leite em pó desnatado. Diluir em água destilada.

#### **Solução salina**

1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>. Diluir em água destilada.

#### **SSC 6X**

0,9 M NaCl, 0,09 M Citrato de sódio. Diluir em água destilada.

#### **TAE**

0,4 M Tris, 20 mM EDTA, 5,7% de Ácido acético. Diluir em água destilada.

#### **Tampão de desfosforilação**

0,5 M Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,5. Diluir em água destilada.

#### **Tampão de fragmentação**

TE, pH 8,0, 20% de Glicerol. Diluir em água destilada.

**Tampão de reparo**

100 mM Tris-HCL, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM Ditioneitol, pH 7,9. Diluir em água destilada.

**TE**

10 mM Tris-HCL, pH 8,0, 0,1 mM de EDTA. Diluir em água destilada.

**TEN9**

50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl. Diluir em água destilada.

**3.3 - Linhagem de bactéria hospedeira*****Escherichia coli* XL1-Blue**

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ M15 Tn10 (Tetr)]*

**3.4 - Espécime de *Amazona aestiva***

O indivíduo da espécie *Amazona aestiva* utilizado para a extração de DNA foi doado pelo IBAMA de Belo horizonte após a sua morte.

**3.5 - Kits utilizados*****Topo shotgun subcloning Kit (Invitrogen)***

Material utilizado para a construção do DNA recombinante.

### DNA purification System (Promega)

Material utilizado para a purificação dos fragmentos de DNA genômico em gel de agarose.

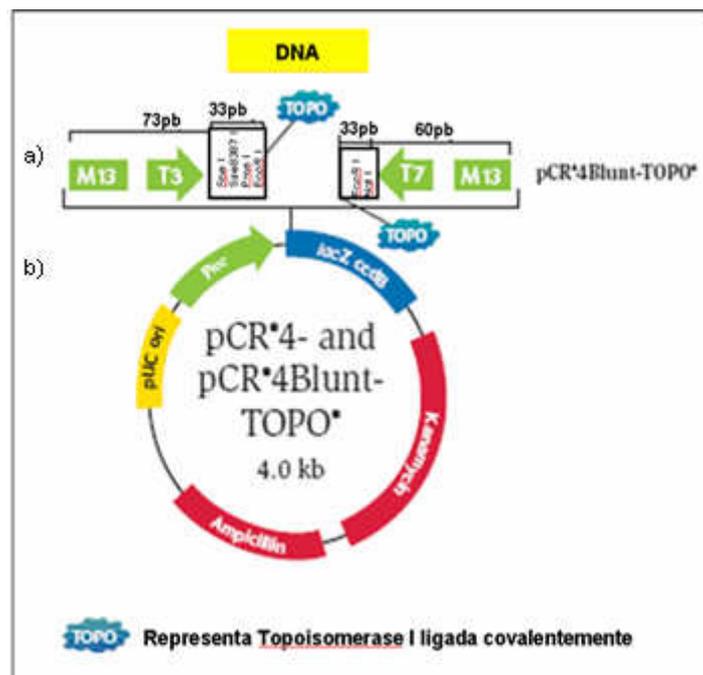
### Nucleotideo ATP (gama-32P) Redivue (GE Healthcare)

Material radioativo utilizado para a marcação das sondas com temas de microssatélites.

### 5' labeling Kit (GE Healthcare)

Kit com enzima utilizado para a ligação do material radioativo a sonda com temas de microssatélites.

## 3.6 - Vetor de clonagem



**FIGURA 4 - Vetor pCR4Blunt-TOPO utilizado na biblioteca genômica de *A. aestiva*.**

**a)** Sítio de clonagem localizado no gene *lacZ* onde é inserido o inserto, possibilitando a seleção por IPTG/X-gal das colônias que possuem o DNA exógeno. TOPO (em azul) representa a Topoisomerase I ligada covalentemente ao vetor. Setas verdes indicam iniciadores universais. **b)** Esquema geral do vetor. Em vermelho estão indicados os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina. Em amarelo está representada a origem de replicação e em azul, o gene *lacZ*, que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase. Fonte: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr4blunttopo\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr4blunttopo_map.pdf).

O vetor de clonagem *pCR4Blunt-TOPO* (Invitrogen) é linearizado e possui topoisomerasas de *Vaccinia virus* covalentemente ligadas às extremidades 3'. São

essas topoisomerasas que catalisam a ligação do fragmento de DNA ao vetor, não sendo necessário o uso da enzima ligase. Além disso, o vetor possui genes de resistência à ampicilina e canamicina e o sítio de clonagem está inserido no gene *lacZ* (**FIG. 4**), que foi utilizado como gene repórter. O fragmento de DNA é inserido no interior do gene *lacZ*, interrompendo o mesmo e tornando o vetor circular.

### 3.7 - Iniciadores M13 para PCR

**M13 Direto (*Forward*)** - 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'

**M13 Reverso (*Reverse*)** - 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'

## 4 - MÉTODOS

### 4.1 - Extração do DNA Genômico de *A. aestiva*

A obtenção de DNA genômico de *A. aestiva* foi feita através de um protocolo de alto rendimento adaptado de Sambrook e colaboradores (1989). Em um pistilo, foram macerados em gelo seco aproximadamente 3 g de tecido muscular de um espécime da ave. O tecido foi colocado em 10 ml de solução tampão TEN9, 500 µl de SDS 20% e 500 µl de proteinase K (10 mg/ml). O material foi incubado a 37 °C por 24 h. Em seguida foi adicionado um volume de fenol, pH entre 7,5 e 8 (*Phoneutria*), misturando-se manualmente por 20 min. Foi acrescentado um volume de clorofórmio e a solução foi misturada por mais 20 min, seguida de centrifugação por 10 min a 3000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado um volume de fenol-clorofórmio 24:1, misturando-se por 40 min e centrifugando novamente por 10 min a 3000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado utilizando-se 1/5 do volume de acetato de amônio 10 M e um volume de isopropanol. O DNA obtido foi lavado com etanol 70% e após secar à temperatura ambiente, foi ressuscitado em 1 ml de TE e armazenado a -20 °C. Foi obtido aproximadamente 300 µg de DNA genômico de *A. aestiva*.

### 4.2 - Fragmentação do DNA Genômico de *A. aestiva*

Para a fragmentação do DNA genômico foi utilizado um nebulizador de acordo com o manual do *Topo Shotgun Subcloning Kit (Invitrogen)*. Este dispositivo usa a compressão de gases, como o nitrogênio, para realizar fragmentação mecânica do DNA. O tamanho dos fragmentos foi de acordo com a pressão e tempo de exposição escolhidos. Foram colocados no nebulizador 50 µg de DNA genômico diluídos em 700 µl de tampão de fragmentação. O aparelho foi conectado a um tanque de nitrogênio e exposto a uma pressão de 10 psi por 90 seg, para obter

preferencialmente fragmentos de DNA de 1000 a 5000 pb. O DNA foi então precipitado, utilizando-se 10% de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e um volume de isopropanol. O DNA obtido foi lavado com etanol 80% gelado e, após secar à temperatura ambiente, foi ressuscendido em 35 µl de TE e armazenado a -20 °C. Após o procedimento foi obtido aproximadamente 40 µg de DNA genômico fragmentado.

### **4.3 - Purificação dos fragmentos de DNA de *A. aestiva***

Para a purificação de fragmentos de tamanho entre 1000 a 2000 pb, foi realizada a purificação de DNA em gel de agarose utilizando *DNA Purification System (Promega)*. Foi realizada eletroforese em agarose 1% e em uma canaleta dupla foram colocados os 35 µl de DNA. Após corrida de 1 h a 80 V e 80 mA, a região do gel onde se encontravam fragmentos de DNA entre 1000 a 2000 pb foi recortada. Adicionou-se 1 ml de solução de ligação (composição não informada pelo fabricante) e a mistura foi colocada em banho-maria, à 65 °C, para o derretimento da agarose. A solução foi então colocada em uma mini-coluna com filtro e ficou à temperatura ambiente por 1 min. Em seguida, foi centrifugada a 13200 rpm por mais 1 min. Foram adicionados 700 µl de solução de lavagem (composição não informada pelo fabricante) e a mini-coluna foi centrifuga a 13200 rpm por 1 min. Em seguida, foram colocados mais 500 µl da solução de lavagem e o material foi centrifugado por 13200 rpm por mais 5 min. Foram adicionados 50 µl de água ultra-pura na mini-coluna e esta foi transferida para um microtubo de 1,5 ml. Após incubação à temperatura ambiente por 1 min, o material foi centrifugado a 13200 rpm por 1 min e o DNA foi estocado a -20 °C. Com esse procedimento foi obtido 20 µg de fragmentos de DNA genômico com tamanho entre 1000 a 2000 pb.

A eliminação de fragmentos menores que 1000 pb foi feita porque fragmentos pequenos que apresentam microssatélites muitas vezes não possuem região flanqueadora suficiente para a elaboração de iniciadores. Já fragmentos muito grandes também não são adequados, uma vez que não é viável sequenciá-los completamente por esta metodologia.

#### 4.4 - Preparo dos fragmentos de DNA de *A. aestiva* para a ligação ao vetor de clonagem

O plasmídeo escolhido para a construção da biblioteca genômica de *A. aestiva* foi o vetor linearizado *pCR4Blunt-TOPO* (Invitrogen). Para que o DNA se tornasse substrato adequado para se ligar a esse plasmídeo, foi necessário fazer o reparo da dupla fita e desfosforilação desse DNA. Foram usadas T4 DNA polimerase e *Klenow* DNA polimerase para incorporar nucleotídeos complementares ao final do fragmento no sentido 5' para 3'. Além disso, a atividade de exonuclease da T4 DNA polimerase foi explorada para degradar nucleotídeos livres no sentido 3' para 5'. Já a desfosforilação foi feita utilizando fosfatase alcalina. Ambos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo da empresa fornecedora. Dessa forma, foi preparada uma solução contendo 5 µl de tampão de reparo, 1 µl de BSA (1 mg/ml), 5 µl de dNTP mix (2,5 mM), 2 µl de T4 DNA polimerase (4 U/µl) e 2 µl de *Klenow* DNA polimerase (4 U/µl), 3 µg de DNA, e 15 µl de água deionizada. Essa solução foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, para a ação das enzimas já citadas. Em seguida, foi incubada a 75 °C por 20 min, para a inativação das enzimas. A desfosforilação foi realizada ao adicionar 35 µl de água deionizada estéril, 10 µl de tampão de desfosforilação e 5 µl de fosfatase alcalina (1 U/µl) e incubar a 37 °C por 60 min. Em seguida, foi feita a purificação do DNA, utilizando 100 µl de fenol-clorofórmio e o DNA foi então precipitado, utilizando-se 10% de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, e três volumes de etanol gelado. O DNA obtido foi lavado com etanol 80% gelado e após secar à temperatura ambiente, foi ressuspendido em 25 µl de água estéril e armazenado a -20 °C. Para a verificação da integridade do DNA foi feita uma eletroforese em agarose 0,8%.

#### 4.5 - Construção do DNA recombinante

A reação de ligação dos fragmentos de DNA de interesse com o vetor foi conforme recomendações do fabricante. Para a realização da ligação ao vetor de clonagem, foram utilizados 1 µl do vetor *pCR4Blunt-TOPO* (10 ng/µl), 2 µl de

fragmentos de DNA genômico (50 ng/μl) e 1 μl de solução salina. A solução foi levemente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida foram acrescentados à reação 100 μl de água deionizada, seguido por incubação a 37 °C por 10 min. A ligação foi então precipitada, utilizando 10% de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e três volumes de etanol. O produto de ligação obtido foi lavado com etanol 80% gelado e após secar à temperatura ambiente, foi ressuscitado em 10 μl de água deionizada.

#### 4.6 - Transformação de bactérias e seleção dos clones recombinantes

Para a transformação de bactérias eletrocompetentes foi utilizado o protocolo adaptado de Yazbeck (2007). Foram colocados em um microtubo de 1,5 ml, 10 μl do produto da ligação e 100 μl de *Escherichia coli* eletrocompetente da linhagem XL1-blue (*Phoneutria*). Após homogeneização, essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (*Biorad*) e submetidos a um pulso elétrico de 2.5 kV em eletroporador. O material foi ressuscitado em meio SOC e incubado a 37 °C por uma hora. Após esse período, foram adicionados 2 ml de meio SOC contendo ampicilina (100 μg/ml), para diluir as bactérias.

Em placas contendo LB Agar e ampicilina (100 μg/ml), foram acrescentados 30 μl de X-gal (50 mg/ml) e 4 μl de IPTG (0,6 mM). Nestas placas foram distribuídos 100 μl da suspensão de bactérias e foram incubadas por aproximadamente 16 h a 37 °C.

O sistema IPTG/X-gal é utilizado para verificar quais colônias possuem o plasmídeo com o fragmento de DNA exógeno. Como o fragmento é ligado ao plasmídeo dentro do gene *lacZ*, as colônias que receberem plasmídeos sem o inserto possuirão o gene ativo, que produzirá a β-galactosidase. Essa enzima cliva o substrato X-gal, liberando um produto insolúvel de coloração azul. Sendo assim, as colônias que não possuem o inserto de interesse terão coloração azul. Já as colônias com o inserto terão o gene *lacZ* inativo, pois foi interrompido pelo fragmento de DNA exógeno, e por isso terão coloração branca.

#### 4.7 - Purificação dos plasmídeos recombinantes

As colônias brancas isoladas foram coletadas das placas de petri para microtubos estéreis de 1,5 ml (1 colônia por tubo) contendo 1,0 ml de meio LB caldo com ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37 °C por 16 h. Após esse período, foi realizada a precipitação dos plasmídeos por lise alcalina, adaptado do protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Os microtubos foram centrifugados a 13200 rpm por 10 min e o meio de cultura foi descartado. O precipitado foi ressuspenso com 10 µl de solução I. Após este passo, foram adicionados 10 µl de solução II e em seguida mais 10 µl de solução III. O material foi mantido em gelo por 5 min e centrifugado a 13200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol. O material foi centrifugado novamente a 13200 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 100 µl de etanol 70% e seco à temperatura ambiente.

Para a averiguação do tamanho médio dos insertos, alguns plasmídeos foram escolhidos aleatoriamente para a realização de PCR, com a intenção de verificar a presença do inserto. A reação de PCR foi feita com as seguintes quantidades de reagentes por reação: 50 ng de DNA molde, tampão PCR IB (*Phoneutria*), 2,5 µl de dNTPs, 5 pMoles de iniciadores M13 direto e M13 reverso, 1 U de Taq polimerase (*Phoneutria*) e água ultra-pura q.s.p. 25 µl. As reações foram realizadas em termociclador com o seguinte programa: 94 °C por 3 min, seguido por 5 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, mais 25 ciclos de 94 °C por 30 seg, 54 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg e finalmente 72 °C por 5 min. Para a eletroforese em gel de agarose 1,5% foram utilizados 10 µl do produto da reação. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µl/ml).

#### 4.8 - Identificação dos clones com microssatélites de interesse

Conforme descrito em Paiva (2007), os plasmídeos purificados foram ressuspenso em 20 µl de TE com 0,06% de Bromofenol. Foram aplicados 0,2 µl

desse material em membrana de Nylon carregada positivamente (*Biorad*), seguindo um molde confeccionado em lâmina de PVC organizado em 27 linhas (A até Z) e 35 colunas (1 até 35) (**FIG. 5**). O DNA foi imobilizado na membrana através do uso do aparelho *Ultraviolet Crosslinker*. O nome de cada clone foi composto pelo número da membrana que ele ocupa, seguido pela sua linha e coluna. Sendo assim, o clone 2C17, por exemplo, estaria na segunda membrana, linha C e coluna 17.



**FIGURA 5 - Molde para aplicação dos clones nas membranas de nylon.**

Cada ponto corresponde ao local da aplicação de um clone. As setas pontilhadas indicam como foram dispostos os clones. As áreas circulares indicam pontos laterais marcados a caneta que serviram de orientação para análise das membranas. O ponto destacado em amarelo exemplifica o clone 2C17. Fonte: Paiva, 2007 com adaptações.

Para a busca de marcadores moleculares foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos de 16 pb marcadas com  $[\gamma^{32}\text{P}]$  ATP radiativo (10mCi/ml – *GE Healthcare*). As sondas eram de diversos temas repetitivos de forma a cobrir o máximo de possibilidades diferentes de repetições (Yazbeck e Kalapothakis, 2007), conforme a **TABELA 2**. A marcação radioativa das sondas foi feita em suas extremidades 5' com um kit 5' *Labelling kit* (*GE Healthcare*) que usa a enzima T4 quinase segundo protocolo do fornecedor. A reação de hibridização foi precedida de uma pré-hibridização, na qual ocorreu o bloqueio da membrana utilizando-se a solução BLOTO e SSC 6X, a 50°C por 14 h. A hibridização foi feita com uma

concentração aproximada de 5 ng de sonda/ml de solução, a 45 °C por 14 h. Após esse período, foram realizadas lavagens de controle da estringência, utilizando-se concentrações cada vez menores de sal (SSC 6x, 3x) e aumentando-se a temperatura (48°C e 55°C), aumentando-se a estringência. Entre cada lavagem, as membranas foram expostas a chapas radiográficas (35 x 43 cm de filme Kodak T-Mat G/RA) por dois períodos de exposição diferentes (4h e 16h) a -80 °C. Após esse período, as chapas foram reveladas e fixadas.

**TABELA 2**

**Seqüências das sondas de oligonucleotídeos de 16 pb marcadas com [ $\gamma$ 32P] ATP radiativo usadas na busca de clones com microssatélites**

<b>Motivo da repetição</b>	<b>Tema da Repetição</b>
<b>Dinucleotídeos</b>	CA, CT e TA
<b>Trinucleotídeos</b>	CAT, CAC, GTA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG
<b>Tetranucleotídeos</b>	GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT,

As auto-radiografias foram sobrepostas ao moldes utilizados para a aplicação dos clones nas membranas, para a determinação dos clones que apresentaram sinal positivo (aqueles que hibridizaram com as sondas de temas repetitivos).

#### **4.9 - Sequenciamento dos clones com microssatélites**

Os clones selecionados foram utilizados para uma nova transformação, para se obter maior quantidade do material para o sequenciamento. As transformações foram realizadas em *E. coli* XL1-blue eletrocompetentes (*Phoneutria*). Após transformação, foi feito um inóculo de cada clone em microtubo de 1,5 ml contendo 1 ml de meio líquido LB e canamicina (50 µg/ml), que foi incubado a 37 °C por 16 h. Em seguida, foi realizada a purificação de plasmídeo por lise alcalina segundo protocolo adaptado de Sambrook e colaboradores (1989). O sequenciamento dos clones positivos foi adaptado de Paiva e Kalapothakis (2008). Ele foi realizado em

sequenciador automático ABI 3130 e para cada reação foram utilizados cerca de 200 ng de DNA plasmidial, 1,6 pmoles de iniciador M13 *Forward* ou M13 *Reverse*, 0,3 µl de *Big Dye Terminator v.3.1 mix* (Applied Biosystems), 1,77 µl de tampão de diluição e água deionizada estéril q.s.p. 10 µl. As reações foram realizadas em termociclador com o seguinte programa: 96 °C por 2 min, seguidos por 44 ciclos de 96 °C por 30 seg, 50 °C por 15 seg, 60 °C por 4 min.

Após a reação no termociclador, o DNA foi precipitado adicionando 1 µl de EDTA 125 mM, 1 µl de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 25 µl de etanol. O material foi deixado à temperatura ambiente por 15 min e centrifugado a 6000 rpm por 25 min. Após a retirada do sobrenadante, o material foi lavado com 35 µl de etanol 70%.

#### 4.10 - Análise do sequenciamento e desenho dos iniciadores

Os resultados do sequenciamento foram analisados por meio dos programas *Phred/Phrap/Consed* (Ewing e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998) para obtenção de uma sequência consenso contígua e de boa qualidade. As sequências correspondentes ao vetor foram retiradas utilizando-se o *site Vecscreen* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html)), produzido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e a busca por microssatélites foi feita pelo *site Microsatellite repeats finder* ([www.biophp.org/minitools/microsatellite\\_repeats\\_finder/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php)).

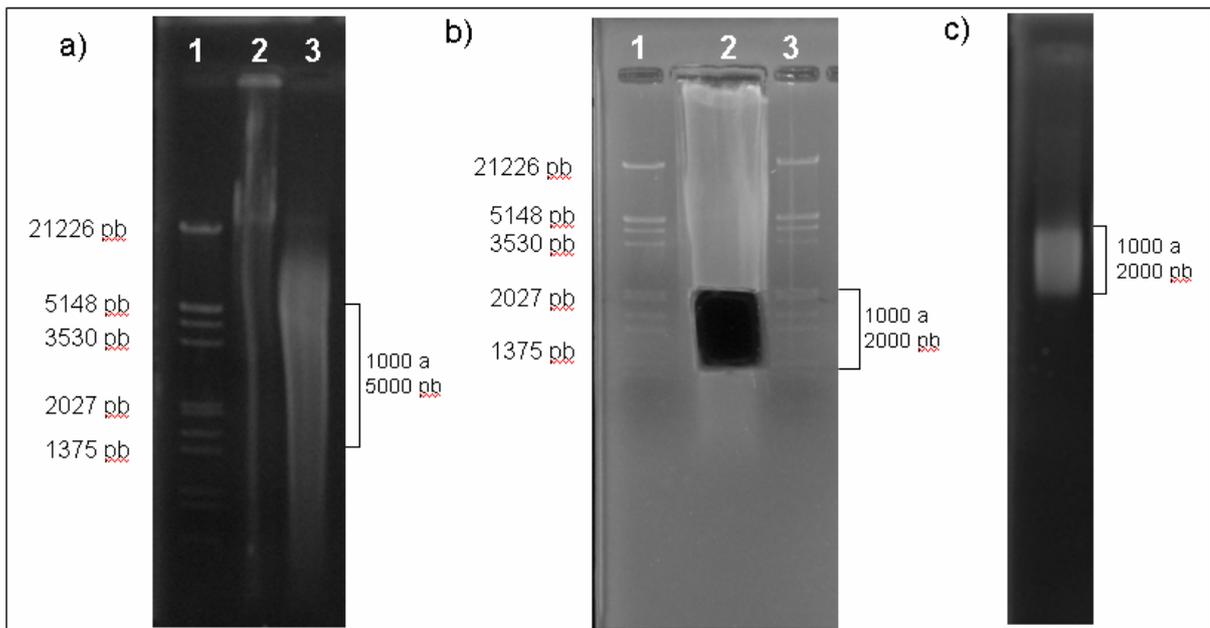
As sequências que possuíam marcadores moleculares de grande tamanho foram selecionadas para o desenho de iniciadores em regiões flangeadoras da região repetitiva. Para a futura realização de *Nested PCR* foram desenhados dois pares de iniciadores para cada região utilizando o programa *Primer3* (Rozen e Skaletsky, 1998).

Todas as sequências geradas por este trabalho foram comparadas com sequências depositadas em banco de dados *on-line*, pelo programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) (<http://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov>), mais especificamente BLASTn, que compara nucleotídeo-nucleotídeo, para verificação de similaridade.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Obtenção dos fragmentos de DNA genômico de *A. aestiva*

O protocolo utilizado para extração de DNA resultou em DNA genômico de alto peso molecular. Sua fragmentação mecânica ocorreu de forma satisfatória gerando muitos fragmentos com tamanhos de 1000 a 5000 pb (**FIG. 6a**). Após corte da região do gel onde se encontravam fragmentos de DNA entre 1000 a 2000 pb (**FIG. 6b**), foi realizada a purificação de grande quantidade de fragmentos de tamanho intermediário (item 4.3), eliminando-se a maior parte dos fragmentos de outros tamanhos, já que os mesmos não estavam visíveis no gel (**FIG. 6c**).

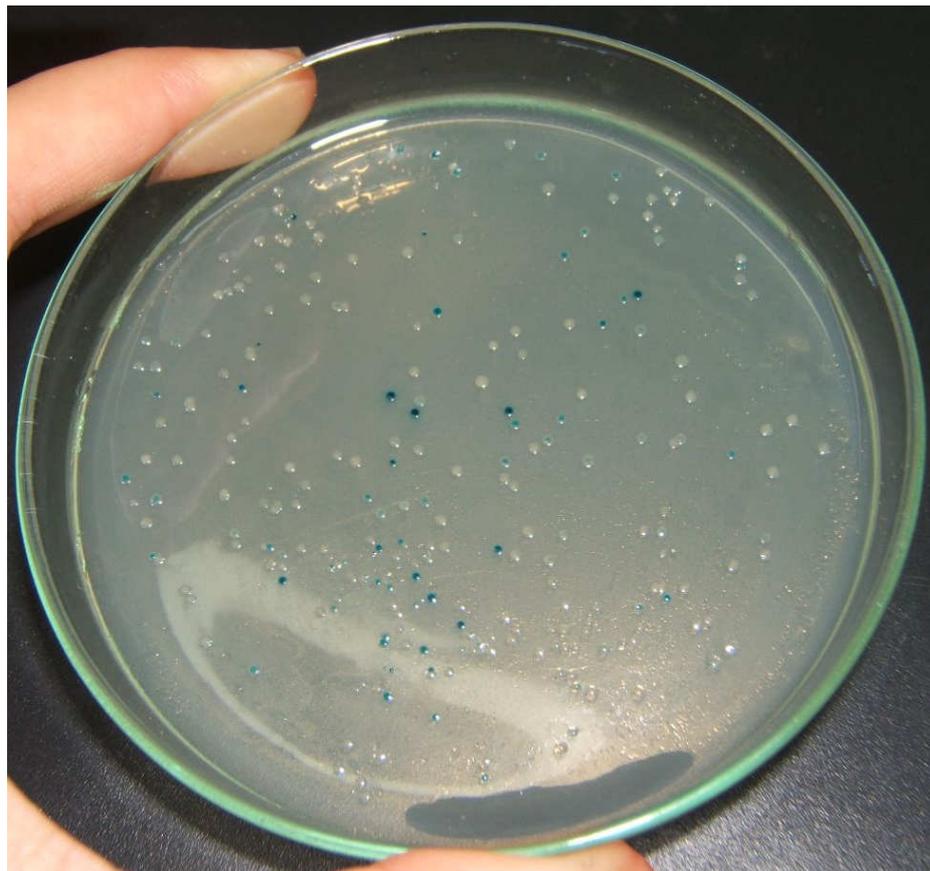


**FIGURA 6 - Obtenção dos fragmentos de DNA genômico de *A. aestiva*.**

Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **a)** Verificação da fragmentação do DNA genômico. Canaletas: **1-** Padrão de peso molecular Lambda DNA/EcoR1 Hind III. **2-** DNA genômico total de *A. aestiva*. **3-** DNA genômico após fragmentação mecânica. Observa-se que foram gerados muitos fragmentos de 1000 a 5000 pb. **b)** Purificação de DNA contido em gel de agarose. Gel após o corte na região correspondente aos tamanhos de 1000 a 2000 pb. Canaletas: **1 e 3-** Padrão de peso molecular Lambda DNA/EcoR1 Hind III. **2-** DNA genômico de *A. aestiva* após fragmentação por pressão de hidrogênio e retirada dos fragmentos de 1000 a 2000 pb. **c)** Resultado da purificação do DNA em gel de agarose.

## 5.2 - Construção da Biblioteca genômica de *A. aestiva*

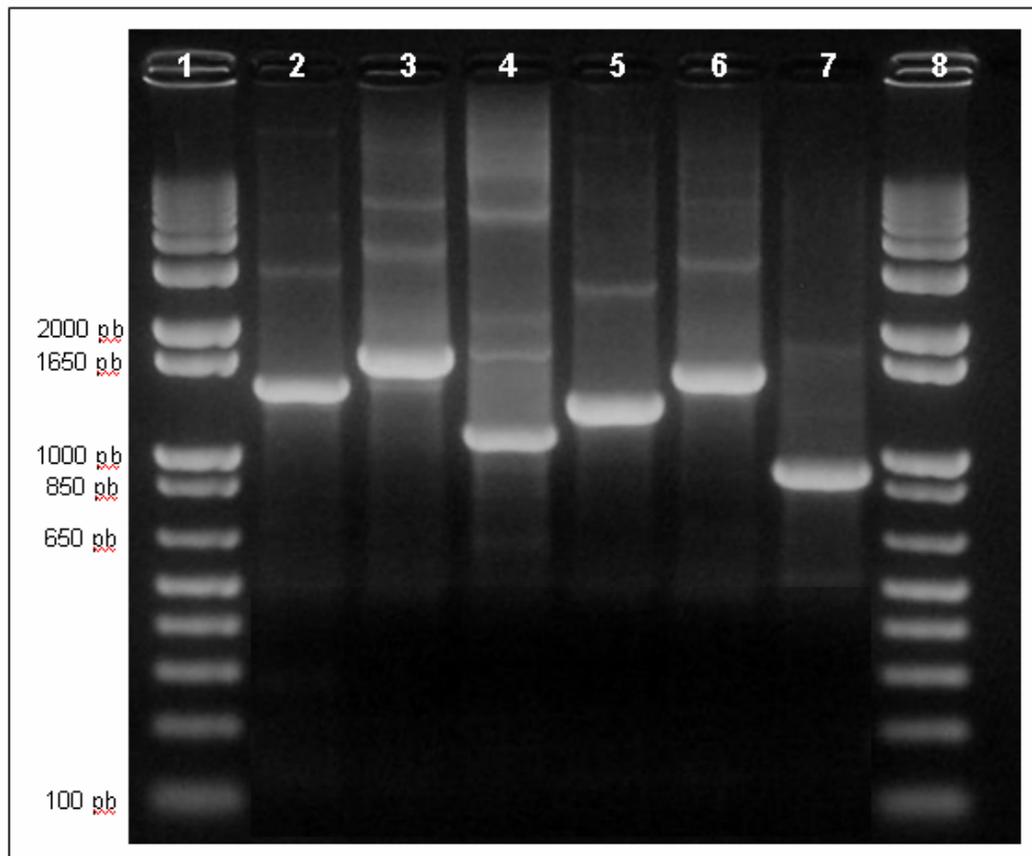
Para ligação dos fragmentos de DNA ao vetor de clonagem *pCR4Blunt-TOPO* (*Invitrogen*), foram realizados o reparo da dupla fita e sua desfosforilação. Em seguida, ocorreu a ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem e este material foi usado para a transformação, por eletroporação, de bactérias *E. coli* da linhagem XL1-blue. Na **FIGURA 7** pode-se observar que a ligação dos fragmentos de DNA ao vetor foi extremamente bem sucedida, uma vez que após plaqueamento do material, obteve-se pelo menos 75% de transformantes que receberam o vetor com o inserto de DNA de *A. aestiva* (colônias brancas), conforme esperado para o protocolo utilizado. Foram obtidas 5173 colônias recombinantes.



**FIGURA 7 - Seleção de colônias pelo sistema IPTG/X-gal.**

*E. Coli XL1-Blue* em placa de Petri contendo meio LB-ágar com ampicilina e sistema de seleção IPTG/X-gal, após eletroporação. As colônias brancas (75% das transformantes) possuem o inserto de DNA de *A. aestiva* interrompendo o gene *lacZ*. Essas colônias foram utilizadas para a construção da biblioteca genômica dessa ave.

Para a construção da biblioteca genômica de *A. aestiva* foram coletadas individualmente as 5173 colônias de *E. coli* com inserto de DNA exógeno. Após crescimento em meio LB caldo com ampicilina (item 4.7), foi realizada a precipitação de plasmídeo por lise alcalina de todos os clones e alguns foram escolhidos aleatoriamente para a realização de PCR com iniciadores universais (M13 direto e reverso) a fim de se verificar a presença e o tamanho de seus insertos. A maioria dos clones possuía insertos de tamanhos variáveis entre 1000 e 2000 pb (**FIG. 8**). Entretanto, foi observada a presença de insertos menores que 1000 pb em alguns clones (**FIG. 8**, canaleta 7), apesar da purificação feita anteriormente.



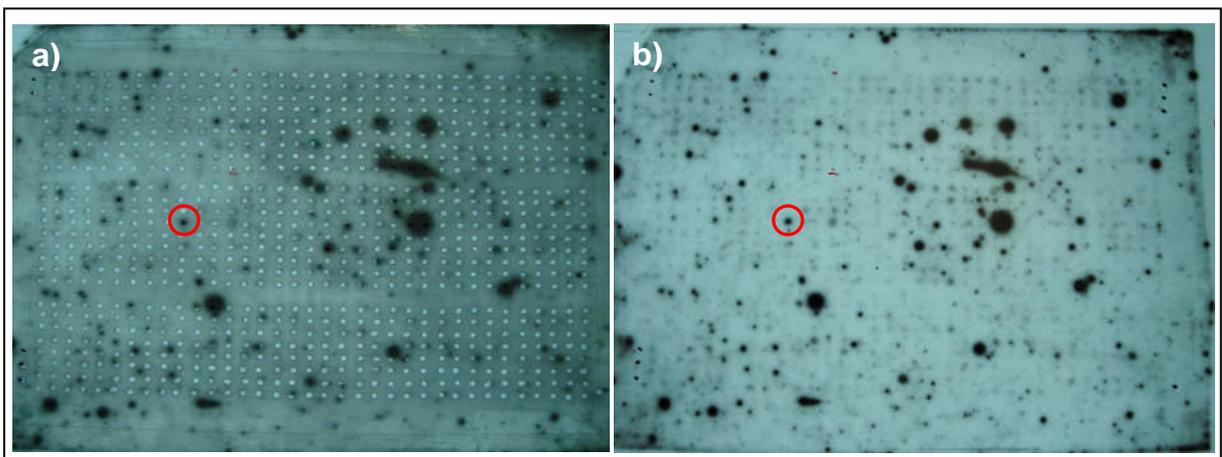
**FIGURA 8 - Verificação do tamanho dos fragmentos da biblioteca genômica.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Cada amplicon foi gerado a partir de seqüências de DNA de *A. aestiva* com diferentes pesos moleculares, clonados em plasmídeo *pCR4Blunt-TOPO*. Foram utilizados para a amplificação iniciadores universais M13 complementares à seqüência presente no plasmídeo. Nas canaletas 1 e 8 foram aplicados padrão de peso molecular 1 Kb plus (*Invitrogen*). Nas demais canaletas (2 a 7) foram aplicados os amplicons gerados de plasmídeos aleatórios da biblioteca.

### 5.3 - Identificação e caracterização de microssatélites nos clones da biblioteca genômica de *A aestiva*

Os 5173 clones da biblioteca foram aplicados em 6 membranas de nylon carregadas positivamente e em seguida foram hibridizados com sondas radioativas de temas repetitivos. Após revelação das auto-radiografias (**FIG. 9**) todos os sinais positivos foram considerados, mesmo os fracamente positivos, para diminuir a possibilidade de perda de microssatélites nesta etapa. Foram contabilizados 662 clones positivos, que representam 12,8% do total da biblioteca.

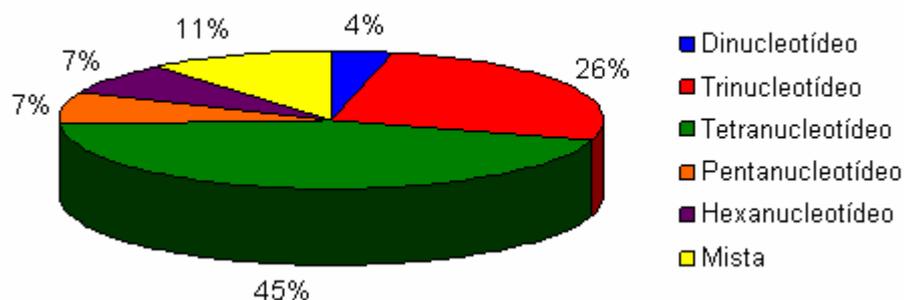
Foram seqüenciados 83 clones com sinal positivo e destes, 18 continham repetições com pelo menos 12 pb, ou seja, aproximadamente um quinto dos clones seqüenciados possuíam microssatélites. Então, estima-se que a porcentagem real de clones com microssatélites da biblioteca é de 2,5%.

Ao todo foram encontradas 27 seqüências repetitivas com pelo menos 12 pb, sendo que em alguns clones foram encontradas mais de uma seqüência. A maioria era de tetranucleotídeos (12), seguidas de trinucleotídeos (7). Foram encontradas 3 seqüências imperfeitas, 2 pentanucleotídeos, 2 hexanucleotídeos e apenas 1 dinucleotídeo (**GRÁF. 2**). Essas seqüências serão divulgadas em uma futura publicação (para informações: kalapothakis@gmail.com).



**FIGURA 9 - Auto-radiografia de hibridização com sonda radioativa da membrana 2.**

**a)** Auto-radiografia com o molde de aplicação sobreposto. **b)** Os pontos negros são clones com o sinal positivo para as sondas de microssatélites. Em destaque o clone 2M10 como exemplo de clone positivo.



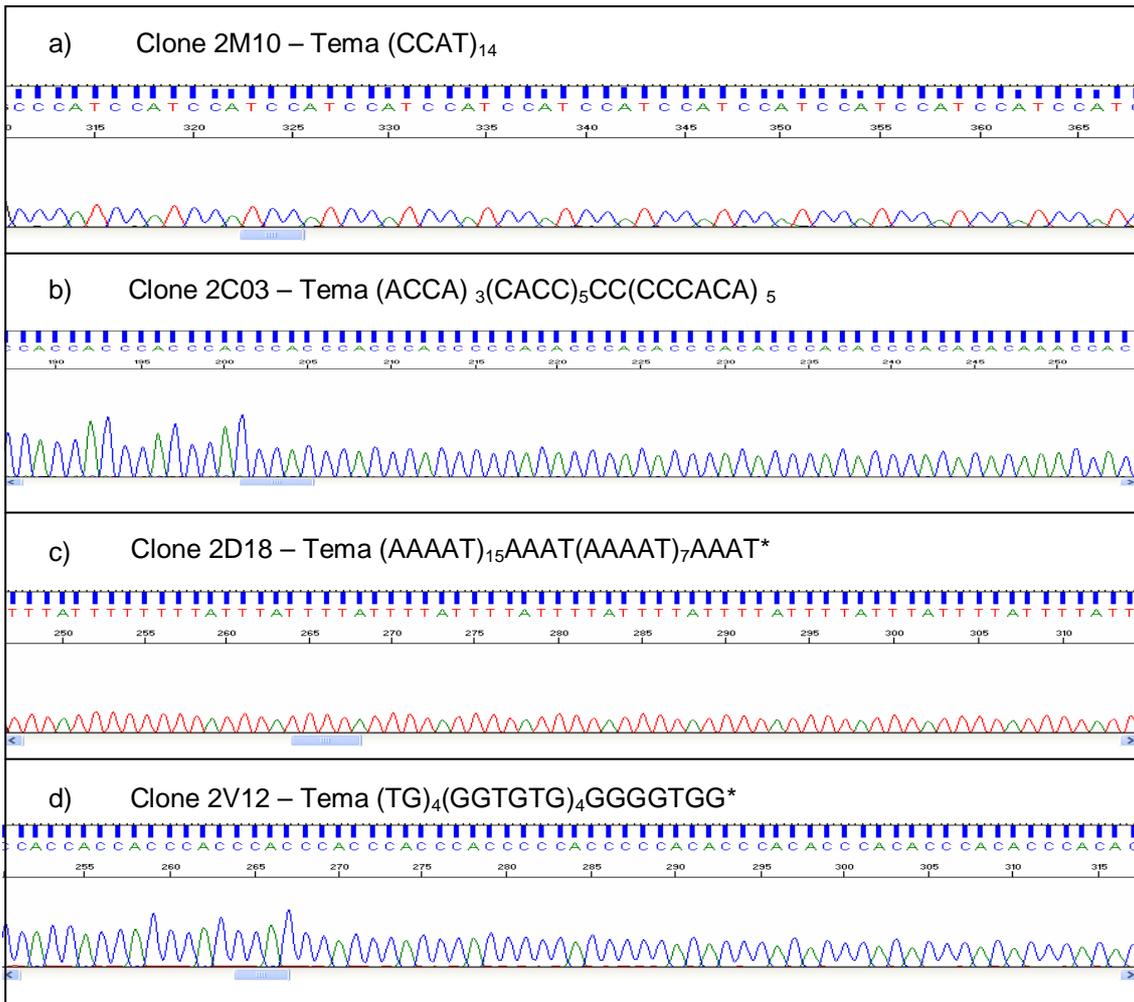
**GRÁFICO 2 - Distribuição dos microssatélites quanto ao número de bases de suas repetições.**

A maioria dos microssatélites encontrados eram de trinucleotídeos ou tetranucleotídeos.

Foram encontrados 4 microssatélites de grande tamanho e, por isso, potencialmente polimórficos, sendo um deles perfeito, ou seja, que contém apenas um tipo de repetição e 3 imperfeitos, que continham mais de uma repetição e interrupções. Na **FIGURA 10** encontra-se a o nome do clone, a seqüência e parte do eletroferograma desses microssatélites.

Foi realizado o consenso das seqüências de 50 clones que possuíam seqüenciamento direto e reverso e foram obtidos 34 *contigs* (grupos contínuos de seqüência de DNA) (dados não mostrados).

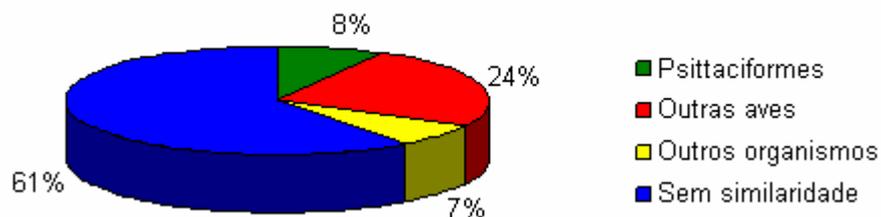
As seqüências geradas foram comparadas com seqüências depositadas em banco de dados *on-line*, utilizando o programa BLAST, mais especificamente o BLASTn opções “*Nucleotide collection*” e “*MegaBLAST*” que compara grandes seqüências nucleotídeo-nucleotídeo, para verificação de alta similaridade. Aproximadamente 61% das seqüências obtidas por este trabalho não possuía similaridade com nenhuma outra seqüência do banco de dados. Das seqüências com similaridade, a grande maioria era composta de seqüências de aves, incluindo algumas da ordem Psittaciformes, e apenas uma pequena parte teve similaridade com outros grupos de organismos (**GRAF. 3**). O detalhamento dos resultados encontram-se no **APÊNDICE A**.



**FIGURA 10 - Eletroferogramas mostrando trechos de microssatélites.**

Eletroferogramas com trechos das seqüências dos 4 maiores microssatélites encontrados. Acima de cada eletroferograma encontra-se o nome do clone e o tema do microssatélite.

\* imagem do sequenciamento correspondente à fita complementar da descrição do microssatélite, portanto sua seqüência é o reverso complementar da descrição do microssatélite.



**GRÁFICO 3 - Resultado de similaridade das seqüências no programa BLAST.**

Para a maioria das seqüências deste trabalho não foi encontrada nenhuma similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados.

#### 5.4 - Desenho de iniciadores para Nested PCR

Os 4 maiores microssatélites já citados foram escolhidos para o desenho de dois pares de iniciadores para *Nested* PCR, pois continham grande número de repetições e regiões flanqueadoras favoráveis para a confecção desses iniciadores. Todas as regiões escolhidas são compostas em sua maior parte de repetições de tetranucleotídeos a hexanucleotídeos, então, mesmo polimorfismos de adição ou subtração de uma única repetição serão facilmente visualizados em gel de acrilamida ou análise de fragmento por seqüenciador ABI 3130.

Os clones escolhidos e seus respectivos pares de iniciadores estão na **TABELA 3**.

TABELA 3

**Loci de microssatélites com seus pares de iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento e tamanho do amplicon.**

<b>Locus (nº do clone)</b>	<b>Tema da repetição</b>	<b>Iniciadores*</b>		<b>Temperatura de anelamento</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
<b>2C03</b>	(ACCA) <sub>3</sub> (CACCC) <sub>5</sub> CC(CCCACA) <sub>5</sub>	Externos	Externo F 1 Externo R 1	55,3 °C	517 pb
		Internos	Interno F 1 Interno R 1	57,8 °C	420 pb
<b>2D18</b>	(AAAAT) <sub>15</sub> AAAT(AAAAT) <sub>7</sub> AAAT	Externos	Externo F 5 Externo R 5	64,0 °C	840 pb
		Internos	Interno F 5 Interno R 5	61,4 °C	264 pb
<b>2M10</b>	(CCAT) <sub>14</sub>	Externos	Externo F 38 Externo R 38	60,8 °C	584 pb
		Internos	Interno F 38 Interno R 38	57,4 °C	265 pb
<b>2V12</b>	(TG) <sub>4</sub> (GGTGTG) <sub>4</sub> GGGGTGG(GGGT) <sub>6</sub> (GGT) <sub>2</sub>	Externos	Externo F 67 Externo R 67	59,2 °C	709 pb
		Internos	Interno F 67 Interno R 67	58,5 °C	413 pb

\* As seqüências dos iniciadores elaborados neste trabalho serão divulgadas em uma futura publicação (para informações: kalapothakis@gmail.com).

## 6 - DISCUSSÃO

Entre os grupos de vertebrados, o grupo das aves é considerado como o que possui a menor quantidade de microssatélites. Essa diferença é explicada porque a quantidade de microssatélites tende a ter correlação positiva com tamanho do genoma (Ellegren, 2004) e, entre os tetrápodos, as aves possuem o menor genoma (Hughes e Hughes, 1995). Alguns estudos demonstram que essa diferença no tamanho ocorre porque os íntrons nas aves são menores. Hughes e Hughes (1995) compararam íntrons e éxons de 31 genes homólogos entre humanos e galinhas e observaram que os íntrons de galinhas são significativamente menores, mas não houve diferença significativa entre o tamanho dos éxons. Íntrons menores também contribuem para as aves possuírem uma quantidade menor de microssatélites, já que os mesmos se encontram com maior frequência em áreas não codificantes do genoma (Zane *et al.*, 2002).

Devido a menor quantidade de microssatélites em aves, muitos trabalhos recomendam o uso de bibliotecas enriquecidas para estudos nesse grupo de vertebrados, por considerarem a metodologia tradicional utilizada trabalhosa e menos eficiente para o isolamento de marcadores moleculares em aves (Zane *et al.*, 2002).

As bibliotecas enriquecidas são aquelas em que os fragmentos com microssatélites são previamente selecionados de um conjunto de fragmentos do DNA, para em seguida ser feita a montagem da biblioteca. Zane e colaboradores (2002) fizeram uma revisão de diversas metodologias para a construção de bibliotecas enriquecidas. Nessas bibliotecas geralmente são usadas uma baixa variedade de temas de sondas, a maioria de dinucleotídeos ou trinucleotídeos (Russello *et al.*, 2001; Caparroz *et al.*, 2003; Sainsbury *et al.*, 2004) o que gera dificuldade na escolha da repetição a ser usada, já que comparações de vários genomas demonstram que os temas mais frequentes de microssatélites são muito variáveis entre os diferentes organismos (Ellegren, 2004).

Já nas bibliotecas tradicionais, não enriquecidas, todos os fragmentos de DNA são utilizados para a construção da biblioteca e após a construção é feita a seleção dos clones com microssatélites. Apesar de ser mais trabalhosa e necessitar de maior tempo para sua montagem, a biblioteca não enriquecida possui a

vantagem de gerar marcadores com maior aleatoriedade, de diferentes regiões do genoma e não há limites para a variedade de temas de sondas utilizadas.

No presente trabalho foi realizada a construção de uma biblioteca genômica parcial não enriquecida do genoma de *A. aestiva*, seguida de varredura com sondas radioativas para o isolamento de microssatélites. Apesar da dificuldade intrínseca da espécie estudada, nossos resultados se mostram promissores. A porcentagem de clones positivos isolados por bibliotecas tradicionais em aves é de 0,025 a 1,7% (Zane *et al.*, 2002) e em nosso trabalho estima-se que 2,5% dos clones possuam microssatélites. O isolamento de microssatélites para *A. aestiva* ocorreu de forma satisfatória, com o isolamento de *loci* de microssatélites compostos em sua maior parte de repetições de tetranucleotídeos a hexanucleotídeos. Marcadores moleculares com esses motivos de repetição facilitam as análises posteriores e são preferidos em exames de paternidade. Além disso, quatro *loci* encontrados possuíam grande número de repetições, tendo maior possibilidade de serem polimórficos (Schlotterer, 2000).

A hibridização com uma grande variedade de sondas precisa ser feita a uma temperatura baixa, de 45 °C, devido à diferença do conteúdo de citosina e guanina em cada sonda. A desvantagem deste processo foi que alguns clones com sinal positivo na hibridização não apresentaram microssatélites após sequenciamento (falso positivo), mas em contrapartida, possibilitou que as sondas hibridizassem em temas de repetição que não eram totalmente complementares, o que aumentou ainda mais a possibilidade de isolamento de microssatélites de temas variados, mesmo quando não havia uma sonda perfeitamente complementar.

Foram encontrados poucos microssatélites de dinucleotídeos, e estes eram muito pequenos, o que corrobora a observação feita por Primmer e colaboradores (1997), que compararam a abundância de diferentes temas de repetições no genoma de aves e mamíferos. Foi observado que repetições de dinucleotídeos são muito menos freqüentes no DNA de aves e, quando ocorrem, geralmente são seqüências de repetições curtas. Entretanto, para a maioria das repetições de trinucleotídeos e tetranucleotídeos não foi observada diferença significativa na abundância entre os dois grupos analisados (Primmer *et al.*, 1997).

Após análise no banco de dados do *Genbank*, Primmer e colaboradores (1997) observaram que as repetições mais comuns no genoma de aves foram (AGG)<sub>n</sub>, (CCG)<sub>n</sub>, (AAAC)<sub>n</sub>, (AAAT)<sub>n</sub> e (CA)<sub>n</sub>, embora esse último tema geralmente

fosse de seqüências muito pequenas, com menos de 10 repetições. Neste trabalho não foi encontrado nenhum microssatélite com os temas citados acima, sendo que o mais próximo foi do microssatélite mais extenso encontrado, que era de tema (AAAAT)<sub>n</sub>.

A maioria das bibliotecas genômicas é construída com fragmentos de DNA de 200 a 1000 pb (Robertson *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2007). Mas esse tamanho reduzido dos fragmentos faz com que frequentemente um microssatélite encontrado não possa ser utilizado porque a área flanqueadora é pequena demais, impossibilitando a elaboração de iniciadores (Robertson *et al.*, 2000). Com o intuito de diminuir as perdas de microssatélites encontrados por falta de área flanqueadora, neste trabalho a biblioteca genômica foi construída com fragmentos maiores de DNA, de 1000 a 2000 pb. Os quatro maiores *loci* de microssatélites encontrados possuíam regiões com tamanho suficiente para a elaboração de iniciadores.

Não foram elaborados iniciadores para os microssatélites pequenos (12 a 20 pb) porque a probabilidade deles serem polimórficos é muito pequena. Na biblioteca genômica parcial de *Forbus passerinus* (Hughes *et al.*, 1998) foram sequenciados centenas de clones positivos para repetições de tema AAT. A maioria dos clones possuía microssatélites com menos de 7 repetições do tema, ou seja, menos de 21 pb, e estes não eram polimórficos. Foram encontrados 8 microssatélites polimórficos, com 8 a 17 repetições do tema.

Na biblioteca de *A. guildingi* (Russello *et al.*, 2001; Russello *et al.*, 2005) foram isolados 16 *loci* de microssatélites polimórficos de tema GT com nove ou mais repetições, na biblioteca de *A. ararauna* (Caparroz *et al.*, 2003) foram isolados 5 *loci* de temas GT ou CT e na de *A. leucocephala* (Taylor e Parkin, 2007b) foi isolado apenas 1 *loci* polimórfico de microssatélite. Para a espécie africana *Psittacus erithacus* (Taylor e Parkin, 2007a), foram isolados 11 *loci* polimórficos de microssatélite com temas de tetranucleotídeos. Já para os psitacídeos da Oceania e Ásia, em *S. habroptilus* (Robertson *et al.*, 2000) foram isolados 7 *loci* de microssatélites com 9 ou mais repetições de tema CA, para *N. meridionalis* (Sainsbury *et al.*, 2004) foram isolados 6 *loci* de microssatélites de temas variados e para *C. forbesi* (Chan *et al.*, 2005) foram isolados 8 *loci* polimórficos. Na espécie *C. moluccensis* (Taylor e Parkin, 2007b) foram isolados 4 microssatélites polimórficos. A maioria desses trabalhos testou a amplificação heteróloga em outros psitacídeos.

A amplificação ocorreu com sucesso quando testadas em espécies filogeneticamente próximas, geralmente pertencentes ao mesmo continente da espécie em que foi isolado inicialmente o microssatélite.

As sequências geradas por este trabalho (com ou sem a presença de microssatélites) foram comparadas com outras sequências depositadas em banco de dados *on-line* através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para busca de similaridade. Foi observado que 61% das seqüências não apresentaram similaridade com a de nenhum outro organismo, 32% possuíam similaridade com outras sequências de aves, incluindo algumas da ordem *Psittaciformes*, mas nenhuma era da espécie *A. aestiva*. Apenas 7% possuíam similaridade com outros organismos. O alto número de seqüências sem similaridade e o fato de não ter ocorrido similaridade com nenhuma seqüência de *A. aestiva* presente nos bancos de dados indica que ainda há poucos estudos envolvendo o conhecimento do genoma desta ave. Em uma busca rápida nos bancos de dados do *NCBI* é possível verificar que para *A. aestiva* há somente 165 sequências de nucleotídeos e 161 sequências de proteínas, sendo que ambas as seqüências são de algumas poucas proteínas, como a citocromo oxidase, NADH desidrogenase, ATP sintase ou regiões de RNA ribossomal, ou seja, apenas uma região muito pequena do genoma dessa espécie é conhecida. Sendo assim, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento de mais uma pequena parte do genoma desta ave. Além disso, os microssatélites isolados poderão ser utilizados em diversos estudos sobre a biologia desta espécie.

## 6.1 - Perspectivas

Este trabalho constitui uma etapa inicial que possibilita o desenvolvimento de diversos outros estudos. Os iniciadores propostos já foram construídos e em breve será feita a padronização da reação de PCR e estudos para verificação de polimorfismo e frequência alélica dos *loci* descritos. Para isso, já se encontram disponíveis no laboratório amostras de sangue de 100 indivíduos da espécie *A. aestiva*, cedidas pelo IBAMA de Belo Horizonte. Além disso, ainda existem cerca de 600 clones positivos que logo serão seqüenciados, em busca de novos microssatélites. Os *loci* de microssatélites descritos por este trabalho e demais

marcadores que poderão ser encontrados após o sequenciamento dos clones restantes serão utilizados para elaboração de teste de paternidade para esta ave. O teste de paternidade será uma nova ferramenta que poderá auxiliar na diminuição da retirada de *A. aestiva* de seu habitat natural, já que será possível verificar se os exemplares comercializados têm origem em cativeiro, sendo sua venda legalizada, ou são silvestres, com venda ilegal.

Os microssatélites gerados pelo trabalho também poderão ser utilizados em diversos estudos sobre a biologia básica desta ave, como verificação do comportamento sexual (verificar ocorrência de cópula *extra-pair*), genética de populações, reconstruções filogenéticas e avaliações do *status* de conservação desta espécie, podendo contribuir também para futuros estudos de manejo sustentável das populações de *A. aestiva*. Como mostrado em outros trabalhos, também pode ser testada a amplificação heteróloga para outras espécies filogeneticamente próximas da família *Psittacidae*, e caso tenha resultado satisfatório, esses marcadores poderão ser utilizados em outras espécies de psitacídeos.

## 7 - CONCLUSÃO

O presente trabalho isolou quatro novos microssatélites para a ave *A. aestiva*. A construção da biblioteca genômica primária foi realizada com sucesso com a obtenção de 5173 clones. Após eficaz triagem com sondas radioativas, diferentes temas de microssatélites, alguns com quatro ou mais pares de base, foram isolados para esta ave. Após sequenciamento de parte dos clones positivos obteve-se a estimativa de que 2,5% dos clones possuam microssatélites. Dos clones seqüenciados, foram encontrados quatro microssatélites de grande tamanho, com alta possibilidade de serem polimórficos. Para eles foram elaborados dois pares de iniciadores para realização de *Nested PCR*. Ao comparar as seqüências geradas com seqüências já depositadas em banco de dados *on-line*, a maioria das seqüências não obtiveram similaridade, e poucas obtiveram similaridade com seqüências de outras aves, demonstrando que o genoma deste grupo ainda é pouco conhecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANMARKRUD, J.A; KLEVEN, O; BACHMANN, L; LIFJELD, J.T. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC evolutionary biology*, Inglaterra, 8, 138, mai 2008.

ALTSCHUL, S.F; GISH, W; MILLER, W; MYERS, E.W, LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of molecular biology*, Inglaterra, 215, 3, 403-410, out 1990.

BENNETT, Peter M; OWENS, Ian P.F. Variation in extinction risk among birds: chance or evolutionary predisposition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, Inglaterra, 264, 401-408, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Criadouros Comerciais. 2006. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/fauna/criadouros/comerciais.pdf>> Acesso em ago 2009.

*BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL*. Busca de similaridade com sequências depositadas em banco de dados. Disponível em: <[http://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi?page=nucleotides&program=BLASTn&BLAST\\_programs=megaBLAST&page\\_type=BLASTsearch&show\\_defaults=on](http://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi?page=nucleotides&program=BLASTn&BLAST_programs=megaBLAST&page_type=BLASTsearch&show_defaults=on)> Acesso em: ago 2009

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 5197 de 03 de janeiro de 1967. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L5197.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L5197.htm)> Acesso em ago 2009

CAPARROZ, R; MIYAKI, C.Y; BAKER, A.J. Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular ecology notes*, Inglaterra, 3, 3, 441-443, set 2003.

CAPARROZ, Renato; LEITE, Kelly C. E; CHINALIA, Leandro, A; MIYAKI, Cristina, Y; COLLEVATTI, Rosane G. Characterization of microsatellite loci in three species of Amazona (Psittaciformes) using heterologous primers. *Ornitologia neotropical*, Estados Unidos, 18, 439-444, 2007.

CHAN, Chi-hang; BALLANTYNE, Kaye, N; LAMBERT, David, M; CHAMBERS, Geoffrey K. Characterization of variable microsatellite loci in Forbes' parakeet (*Cyanoramphus forbesi*) and their use in other parrots. *Conservation Genetics*, Holanda, 6, 4, 651-654, jul 2005.

COLLAR, N.J; JUNIPER, A.T. Dimensions and causes of the parrot conservation crisis. In: BEISSINGER, Steven R (Ed.); SNYDER, Noel F.R (Ed.). *New World Parrots in crisis: Solution from conservation biology*. Estados Unidos: Smithsonian Institution Press, 1992, capítulo 1, p. 1-24.

ELLEGREN, Hans. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews. Genetics*, Inglaterra, 5, 6, 435-445, jun 2004.

EWING, B; GREEN P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, Estados Unidos, 8, 3, 186-194, mar 1998.

GALETTI, Mauro; GUIMARÃES JR., Paulo R; MARSDEN, Stuart J. Padrões de riqueza, risco de extinção e conservação dos psitacídeos neotropicais. In: Galetti, Mauro (Ed.); Pizo, Marco Aurélio (Ed.). *Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil*. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas, 2002, capítulo 1, p. 17-26.

GEBHARDT, Kara, J; WAITS, Lisette P. Cross-species amplification and optimization of microsatellite markers for use in six Neotropical parrots. *Molecular ecology resources*, Inglaterra, 8, 4, 835-839, jun 2008.

GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D., Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. *The journal of heredity*, Estados Unidos, 88, 5, 335-342, set-out 1997.

GORDON, D; ABAJIAN, C; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, Estados Unidos, 8, 3, 195-202, mar 1998.

HUGHES, Austin L; HUGHES, Marianne K. Small genomes for better flyers. *Nature*, Inglaterra, 377, 6548, 391, out 1995.

HUGHES, Colin R; MELLAND, Rebecca R; BEISSINGER, Steven R. Polymorphic trinucleotide microsatellite loci for a neotropical parrot, the green-rumped parrotlet, *Forpus passerinus*. *Molecular ecology*, Inglaterra, 7, 9, 1247-1248, set 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Criadouros Comerciais. 2006. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/fauna/criadouros/comerciais.pdf>> Acesso em ago 2009.

INVITROGEN. Apresenta o mapa do vetor pCR4Blunt-TOPO. Disponível em: <[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr4blunttopo\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr4blunttopo_map.pdf)> Acesso em: jun. 2008.

GUPTA, Sandeep Kumar, VERMA, Sunil Kumar; SINGH, Lalji. Molecular insight into a wildlife crime: the case of a peafowl slaughter. *Forensic science international*, Irlanda, 25; 154, 214-217, nov 2005.

LAGOA, A.M; MAGALHÃES, T; PINHEIRO, M.F. Genetic analysis of fingerprints – Could WGA or Nested PCR be alternatives to the increase of PCR cycles number? *Forensic science international, Genetics Supplement Series 1*, Irlanda, 48-49, 2008.

LEITE, K.C.E; SEIXAS, G.H.F; BERKUNSKY, I; COLLEVATTI, R.G; CAPARROZ, R. Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. *Genetics and molecular research, GMR*, Brasil, 7, 3, 819-829, set 2008.

LI, You-Chun; KOROL, Abraham B; FAHIMA, Tzion; BEILES, Avigdor; NEVO, Eviatar. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology*, Inglaterra, 11, 12, 2453-2465, dez 2002

LONGATTO, José Amorim; SEIXAS, Gláucia Helena Fernandes. Experiências de fiscalização do tráfico de animais silvestres em Mato Grosso do Sul. *Natureza e Conservação*, Brasil, 5, 1, 26-34, abr 2004.

LORENZINI, Rita. DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: a case study. *Forensic science international*, Irlanda, 29, 153, 218-221, out 2005.

MANEL, Stéphanie; BERTHIER, Pierre; LUIKART, Gordon. Detecting wildlife poaching: Identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*, Estados Unidos, 16, 3, 650-659, jun 2002.

MICROSATELLITE REPEATS FINDER. Desenvolvido pelo BioPHP. Localiza seqüências de bases repetitivas. Disponível em <[www.biophp.org/minitools/microsatellite\\_repeats\\_finder/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php)> Acesso em: jul. 2008

MIYAKI, Cristina Yumi; EBERHARD, Jessica. Genética da conservação de psitacídeos. In: Galetti, Mauro (Ed.); Pizo, Marco Aurélio (Ed.). *Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil*. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas, 2002, capítulo 1, p. 17-26.

PAIVA, Ana Luiza Bittencourt. *Isolamento e caracterização de microssatélites de pimelodus maculatus (Pisces, siluriformes)*. 2007. 75 f. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PAIVA, Ana Luiza B; KALAPOTHAKIS, Evanguedes. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Molecular ecology resources*, Inglaterra, 8, 5, 1078-1080, set 2008.

PINHO, João Batista; NOGUEIRA, Flávia Maria de Barros. Mostra da retirada de psitacídeos em cativeiro na cidade de Cuiabá e Pantanal de Poconé, Mato Grosso, no período 1995-1997. *Ararajuba*, Brasil, 8, 1, 51-53, jun 2000.

POETSCH, Micaela; SEEFELDT, Sabine; MASCHKE, Marina; LIGNITZ, Eberhard. Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer -- possible employment in forensic applications. *Forensic science international*, Irlanda, 1, 116, 1-8, fev 2001.

PRIMMER, C.R; MOLLER, A.P; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular ecology*, Inglaterra, 5, 3, 365-378, jun 1996.

PRIMMER, Craig R; RAUDSEPP, Terje; CHOWDHARY, Bhanu P; MOLLER, Anders Pape; ELLEGREN, Hans. Low frequency of microsatellite in the Avian genome. *Genome research*, Estados Unidos, 7, 5, 471-482, mai 1997.

RENSHAW, M.A; SAILLANT, E; BROUGHTON, R.E; GOLD, J.R. Application of hypervariable genetic markers to forensic identification of 'wild' from hatchery-raised red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Forensic science international*, Irlanda, 6; 156, 9-15, jan 2006.

ROBERTSON, Bruce C; MINOT, Edward O; LAMBERT, David M. Microsatellite primers for the kakapo (*Strigops habroptilus*) and their utility in other parrots. *Conservation Genetics*, Holanda, 1, 1, 93-95, mar 2000.

ROCHA, Michelle da Silva Pimentel; CAVALCANTI, Priscila Cordeiro de Miranda; SOUSA, Romero de Lima; ALVES, Rômulo Romeu da Nóbrega. Aspectos da comercialização ilegal de aves nas feiras livres de Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Revista de biologia e ciências da terra*, Brasil, 6, 2, 204-221, jul 2006.

ROZEN, S; SKALETSKY, H. Primer 3. Disponível em: <[www.broadinstitute.org/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.broadinstitute.org/genome_software/other/primer3.html)> Acesso em: ago 2009

RUSSELLO, M; CALCAGNOTTO, D; DESALLE, R; AMATO, G. Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular ecology notes*, Inglaterra, 1, 3, 162-164, jan 2001.

RUSSELLO, M.A; LIN, K; AMATO, G; CACCONI, A. Additional microsatellite loci for the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Conservation Genetics*, Holanda, 6, 4, 643-645, jul 2005.

SAINSBURY, James P; MACAVOY, Elizabeth S; CHAMBERS, Geoffrey K. Characterization of microsatellite loci in the Kaka, *Nestor meridionalis*. *Molecular ecology notes*, Inglaterra, 4, 4, 623-625, dez 2004.

SAMBROOK, J; FRITSH, E.F; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor, 1989. 3 Volumes.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of the microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 6, 365-371, set 2000.

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature reviews. Genetics*, Inglaterra, 5, 1, 63-69, jan 2004.

SEIXAS, Gláucia Helena Fernandes; MOURÃO, Guilherme de Miranda. Assessment of restocking blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Brasil. *Ararajuba*, Brasil, 8, 2, 73-38, dez 2000.

SEIXAS, Gláucia Helena Fernandes; MOURÃO, Guilherme de Miranda. Nesting success and hatching survival of the blue-fronted amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brasil. *Journal of Field Ornithology*, Estados Unidos, 73, 4, 399-409, jan 2002.

SICK, Helmut. *Ornitologia brasileira*. 3. ed. Brasília. 1988. 2 Volumes.

SIGRIST, Tomas. *Guia de campo - Avis brasílis*. São Paulo. Avis Brasilis, 2007. 208p.

SINGH, Anju; GAUR, Ajay; SHAILAJA, K.; SATYARE, Bala B.; SINGH, Lalji. A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India. *Forensic science international*, Irlanda, 10;141, 143-147, mai 2004.

STROM, C.M; RECHITKY, S. Use of nested PCR to identify charred human remains and minute amounts of blood, *Journal of forensic sciences*, Estados Unidos, 43, 3, 696–700, mai 1998.

TAYLOR, Tiawanna D; PARKIN, David T. Characterization of 12 microsatellite primer pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across the Psittaciformes. *Molecular ecology notes*, Inglaterra, 7, 1, 163-167, jan 2007a.

TAYLOR, Tiawanna D; PARKIN, David T. Characterization of 13 microsatellite loci for the Moluccan Cockatoo, *Cacatua moluccensis*, and Cuban Amazon, *Amazona leucocephala*, and their conservation and utility in other parrot species (*Psittaciformes*). *Conservation Genetics*, Holanda, 8, 4, 991-994, ago 2007b.

VECSCREEN. Desenvolvido pelo *National Center for Biotechnology Information*, NCBI. Identifica segmentos de sequências de DNA presentes em vetores comerciais. Disponível em <[www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html)> Acesso em jul 2008.

XU, Yan Chun; LI, Bo; LI, Wan Shui; BAI, Su Ying; JIN, Yu; LI, Xiao Ping; GU, Ming Bo; JING, Song Yan; ZHANG Wei. Individualization of tiger by using microsatellites. *Forensic science international*, Irlanda, 30, 151, 45-51, jun, 2005.

YAZBECK, Gabriel de Menezes. *Microssatélites em estudos populacionais de peixes migratórios*. 2007. 139 f. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

YAZBECK, G.M.; KALAPOTHAKIS E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genetics and molecular research: GMR*, Brasil, 6, 4, 1026-1034, out 2007.

ZANE, L; BARCELONI, L; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, Inglaterra, 11, 1, 1-16, jan 2002.

## APÊNDICE A - Resultado da busca por similaridade em bancos de dados *on-line* utilizando o programa BLAST

A **TABELA 4** apresenta os clones para os quais foram encontradas similaridades no banco de dados *on-line*, utilizando o programa BLAST, opções “BLASTn”, “Nucleotide collection” e “MegaBLAST” que compara grandes seqüências nucleotídeo-nucleotídeo, para a verificação de alta similaridade. Verifica-se a descrição da seqüência similar, o *max score*, *e-value*, identidade máxima e o número de acesso da seqüência.

**TABELA 4**

**Clones que possuem similaridade com seqüências depositadas em bancos de dados *on-line***

Clone	Descrição da seqüência com similaridade	Max score	E value	Max ident	Acesso
<b>2B14</b>	Psittacula alexandri eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 8 and partial cds	171	9e-39	138/160 (86%)	EU738680.1
<b>2B15</b>	Gallus gallus arginyltransferase 1 (ATE1), mRNA >emb AJ851454.1  Gallus gallus mRNA for hypothetical protein, clone 3h21	143	1e-30	93/101 (92%)	NM_001079733.1
<b>2B21</b>	Uncultured marine bacterium partial aprA gene for adenosine-5'-phosphosulfate reductase alpha subunit, clone nam73_aprA_28	82.4	2e-12	53/57 (92%)	FM246826.1
<b>2C10</b>	PREDICTED: Taeniopygia guttata misc_RNA (LOC100232164), miscRNA	224	5e-55	152/167 (91%)	XR_054576.1
<b>2C33</b>	Gallus gallus eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2), mRNA >gb U46663.1 GGU46663 Gallus gallus elongation factor 2 mRNA, complete cds	243	3e-60	167/185 (90%)	NM_205368.1
<b>2C34</b>	Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-216E6, complete sequence	89.8	2e-14	68/77 (88%)	AL928892.6
<b>2H07</b>	Gallus gallus BAC clone CH261-112C5 from chromosome ul, complete sequence	87.9	9e-14	56/60 (93%)	AC171011.2
<b>2H11</b>	Gallus gallus H6 family homeobox 3 (HMX3), mRNA	750	0.0	520/574 (90%)	NM_001007985.1
<b>2J26</b>	PREDICTED: Bos taurus PAN2 polyA specific ribonuclease subunit homolog (S. cerevisiae) (PAN2), mRNA	78.7	6e-11	81/100 (81%)	XM_001252988.2
<b>2K02</b>	PREDICTED: Taeniopygia guttata similar to mKIAA1526 protein (LOC100218592), mRNA	296	7e-77	206/229 (89%)	XM_002193443.1
<b>2K06</b>	Alisterus scapularis eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 9 and partial cds	147	1e-31	136/162 (83%)	AC233179.2

Clone	Descrição da sequência com similaridade	Max score	E value	Max ident	Acesso
2M13	Gallus gallus BAC clone CH261-49N7 from chromosome unknown, complete sequence	65.8	5e-07	51/59 (86%)	XM_002192580.1
2T09	Gallus gallus suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), mRNA	320	8e-84	221/242 (91%)	<a href="#">NM_204600.1</a>
2U09	Bordetella bronchiseptica strain RB50, complete genome; segment 10/16	494	3e-136	467/560 (83%)	<a href="#">BX640428.1</a>
2X06	Eudypetes chrysocome CR1 gene for chicken repeat 1, partial sequence, clone: rock2-5	84.2	1e-12	53/57 (92%)	<a href="#">AB235777.1</a>
3R26	Burkholderia phytofirmans PsJN chromosome 2, complete sequence	111	5e-21	285/388 (73%)	CP001053.1
3T14	Taeniopygia guttata chromosome UNK clone TGMCBa-21H12, complete sequence	99.0	4e-17	71/79 (89%)	AC188695.1
3T22	PREDICTED: Gallus gallus SET domain containing (lysine methyltransferase) 7 (SETD7), mRNA	346	2e-91	329/396 (83%)	XM_420409.2
3T25	PREDICTED: Taeniopygia guttata misc_RNA (LOC100217721), miscRNA	302	2e-78	204/222 (91%)	XR_054376.1
4B30	Psittacula alexandri eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 8 and partial cds	231	2e-57	170/191 (89%)	EU738680.1
4C18	Gallus gallus protein tyrosine phosphatase, receptor type, S (PTPRS), mRNA >gb L32780.1 CHKCRYP Gallus gallus protein-tyrosine phosphatase CRYPalpha1 isoform	226	2e-55	164/184 (89%)	NM_205407.1
4Q15	Gallus gallus mRNA for hypothetical protein, clone 30a17	427	3e-116	307/344 (89%)	AJ851773.1
4U35	Chalcopsitta cardinalis pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase (PCBD1) gene, exons 2, 3 and partial cds	215	4e-52	162/184 (88%)	EU738434.1
4W16	Coturnix coturnix groucho-related protein 5 (Grg5) mRNA, partial cds	257	4e-65	187/211 (88%)	AY834285.1
5A01	Homo sapiens BAC clone RP11-735F20 from chromosome 8, complete sequence	52.8	0.001	28/28 (100%)	AC233992.5
5B13	Gallus gallus sal-like 1 (Drosophila) (SALL1), mRNA >gb AF288697.1 AF288697 Gallus gallus spalt 1 (SAL1) mRNA, complete cds	845	0.0	515/541 (95%)	NM_204707.1
5F09	PREDICTED: Taeniopygia guttata similar to RIKEN cDNA B230380D07 (LOC100231241), mRNA	628	6e-177	408/441 (92%)	XM_002195354.1
5G07	PREDICTED: Taeniopygia guttata topoisomerase (DNA) I (LOC100222949), mRNA	633	1e-107	248/262 (94%)	XM_002190004.1
5H30	Alisterus scapularis eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 9 and partial cds	244	5e-61	208/243 (85%)	EU738575.1
5S32	Gallus gallus 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	243	8e-61	200/232 (86%)	DQ018756.1
5V15	Psittacula alexandri eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 8 and partial cds	204	1e-48	140/155 (90%)	EU738680.1
5W30	Cacatua sulphurea voucher NRM 20026154 beta fibrinogen gene, intron 7	187	1e-43	226/282 (80%)	DQ881947.1
5Y05	Gallus gallus finished cDNA, clone ChEST75k6	255	4e-64	181/201 (90%)	CR733233.1

Nota: Alguns clones obtiveram similaridade com mais de uma sequência do banco de dados, mas esta tabela apresenta apenas o resultado de maior Max score.

# 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](#)