

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

SHENIA PEDRO BOM DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITE EM UMA ESPÉCIE DE ROEDOR DA TRIBO
AKODONTINI, *Akodon montensis* (RODENTIA: MURIDAE).**

CURITIBA – PR

2013

SHENIA PEDRO BOM DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITE EM UMA ESPÉCIE DE ROEDOR DA TRIBO
AKODONTINI, *Akodon montensis* (RODENTIA: CRICETIDAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPG-GEN), da Universidade Federal do Paraná, como requisito para à obtenção do título de mestre em Genética.

Orientador: Thales Renato O. de Freitas (UFRGS)

Co-orientadora: Iris Hass (UFPR)

CURITIBA – PR

2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, que olhou por mim e me abençoou nessa jornada cheia de dificuldades, me enviando forças para continuar em muitas vezes que pensei em deixar tudo para trás. Atendeu as minhas orações, me proporcionou paz e serenidade para chegar ao fim e fechar mais um ciclo nessa vida.

À minha família, em especial minha mãe Kátia e ao meu padrasto Ribas, que me incentivaram e apoiaram nas decisões tomadas, que me ampararam e consolaram nos momentos de angústia e choro, que seguraram a minha mão e me não me deixaram cair em momento algum, frisando sempre que o esforço um dia seria recompensado, e será; são eles minha base, meus exemplos, meus amores. Sem esquecer os que apesar de longe, sempre torcem por mim, meu pai Cid, minhas irmãs Sabrina e Samantha e meus irmãos André e Saymon. Minha Vó Ivete pela preocupação, atenção e carinho. Amo todos vocês.

Às minhas grandes e melhores amigas Ana Claudia Arruda de Mattos, Éricka Quinato, Juliana Antunes, Brunna Maria Setti Ximenez e Alessandra de Souza Gebrim que me apoiaram desde o início dessa jornada e hoje se orgulham de me ver concluir essa etapa.

Às meus irmãos de coração João Fernando Saddock e Farid Abraão Gebrim Neto por estarem presente em todos os momentos da minha vida desde que éramos pequeninos e por estarem dividindo comigo mais essa conquista. Vocês são muito especiais.

Aos colegas de profissão, Caroline Elise Waculicz Andrade, Lisandra Santos Ferreira, Paula Moiana da Costa, Ângela Cristina Ikeda, Alejandro Boechat Fernandes, Douglas Herrera Montenegro, Willian dos Santos, Rafael

Ballen, Carlos Eduardo Ibaldo, Samuel Bezerra, Luana Barbosa, Janaína de Sena, Lorena Caroline Pena, Marina Xavier, Liana Alves de Oliveira que dividiram comigo, nestes anos de departamento, conhecimentos e sorrisos.

Aos estagiários do Laboratório de Citogenética Animal, Ana Luisa Kalb, Jaqueline Alcantara, Aline Carvalho, Devânia Patrícia de Jesus, Charles Sezyshta, Marina Vatte, Mariana Mion, Gracyelle Moraes, Fernanda Gatto de Almeida, Marília Batista e Mayara Putrick pelos momentos juntos, de aprendizado, descontração, risadas e desabafos.

À minha co-orientadora, Prof^o Dr. Iris Hass pela orientação, apoio, incentivo, dedicação e carinho. Por acreditar em mim e no meu trabalho. Por me apoiar nas decisões e dificuldades. Por todo conhecimento passado sempre com tanta calma e clareza.

Ao amigo e Prof^o Dr. Ives José Sbalqueiro que me recebeu tão bem dentro do departamento e que me apoiou em todas as decisões, que acreditou em mim, confiou na minha capacidade e não me deixou nunca desistir, apesar de todas as dificuldades, que não foram poucas.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Thales Renato O. de Freitas pela oportunidade, conselhos e orientação. Apesar da pouca convivência, quando nos reuníamos sempre passou seus conhecimentos com atenção.

À minha banca de acompanhamento Daniele Malheiros e Juliana Zanetti por toda ajuda, sugestões e atenção prestada a mim nesse tempo de escrita e análise dos dados.

À Prof^o Dr. Lupe Furtado Alle, por me apresentar a genética no primeiro ano da Graduação e foi ela com toda sua inteligência, alegria e amizade que fez eu me encantar por essa área tão fantástica.

À Profª Dr. Marlise por me receber tão bem em seu laboratório na Universidade Federal de Santa Maria, me ensinando de forma clara e serena todos os passos para o isolamento dos microssatélites.

Ao Profª Dr. Humberto Madeira da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo empréstimo sempre que necessário do equipamento MegaBase1000, do laboratório de Genômica. Sem esquecer da colega Marlise Mauerwerk, que me auxiliou em tudo que era necessário dentro do laboratório.

À Paula Angélica Roratto por sempre arrumar um tempo para horas de skype, me ensinando a rodar os softwares e interpretar os resultados gerados pelos mesmos.

À Erica Barcelos e seu filho Eduardo, pela estadia, ombro amigo, conversas, carinho e atenção nos meses em que passei em Santa Maria – RS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de continuar os estudos.

Ao REUNI - Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Nunca desista dos objetivos, pois a única saída dos fracos é a desistência das coisas e de seus sonhos, mas para os fortes a única alternativa é a persistência daquilo que tanto almejam!”

RESUMO

Os marcadores moleculares de microssatélite são amplamente utilizados em estudos de populações, principalmente por apresentarem uma taxa mais elevada de mutação genética em relação a outras porções do genoma, o que tornam estas sequências altamente polimórficas e informativas. Este trabalho consiste na construção de uma biblioteca genômica enriquecida de microssatélite e na caracterização de nove locos polimórficos para a espécie *Akodon montensis*. A presença destas regiões satélites no genoma deste roedor foi verificada utilizando dois oligonucleotídeos com repetições como sondas (GT e GATA). Um total de 15 iniciadores foram sintetizados, nove deles tiveram sucesso de amplificação e polimorfismo, sendo que o número de alelos nos locos variou de quatro a treze, tendo um média de oito alelos por loco. A heterozigosidade observada e esperada apresenta um intervalo de 0,6250 – 0,7917 e 0,6675 – 0,8980, respectivamente. Os valores de p inferiores a 0,05 indicam uma heterozigosidade baixa e desvio significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para dois dos nove locos. O coeficiente de endogamia próximo à zero (0,1435) implica em 15% do aumento da taxa de homozigose devido a endogamia. Valores de PIC variaram de 0,2342 à 0,5625, classificando a maioria dos iniciadores como mediamente informativo. A caracterização destes microssatélites é relevante para auxiliar na elucidação de questões evolutivas, de dinâmica populacional e da estrutura genética de *Akodon montensis*. Estudos com estes marcadores moleculares podem orientar o manejo e controle de populações deste roedor.

Palavras-chave: Microssatélite, Conservação, *Akodon montensis*.

Abstract

The microsatellite marker molecule is widely used in studies of population, especially for those regions presenting a higher rate of genetic mutation in relation to other parts of the genome, thus rendering this highly polymorphic sequence and informative. This work consists of the construction of a genomic library enriched for microsatellite and characterization of nine polymorphic loci for species *Akodon montensis*. The presence of these satellites regions in the genome of this rodent was verified using two oligonucleotides with repeats as probes (GT and GATA). A total of 15 primers were synthesized, nine of them were successful amplification, polymorphism, and that the number of alleles at each locus varied from four to thirteen, averaging eight alleles per locus. The observed and expected heterozygosity presents a range from 0.6250 to 0.7917 and from 0.6675 to 0.8980, respectively. X^2 values below 0.05 indicate a low heterozygosity and significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for two of the nine locus. After Bonferroni correction three of the five locus came into balance. The inbreeding coefficient close to zero (0.1435) implies 15% of the increase in the rate of homozygosity due to inbreeding. PIC values ranged from 0.2342 to 0.5625, classifying most initiators as mildly informative. The characterization of those microsatellite is relevant to aid to elucidate evolutionary questions, the population dynamics and the genetic structure of *Akodon montensis*. Works with those molecular markers may guide the management and control of this rodent populations.

Keywords: microsatellite, Conservation, *Akodon montensis*.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	01
2. DESENVOLVIMENTO	03
2.1. TAXONOMIA	03
2.2. GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO	12
2.3. OS MICROSSATÉLITES	14
2.4. A CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS GENÔMICA	18
3. JUSTIFICATIVA	22
4. OBJETIVOS	24
4.1. OBJETIVOS GERAIS	24
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1. AMOSTRAS E ÁREA DE COLETA	25
5.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	26
5.3. QUALIDADE DA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	27
5.4. ISOLAMENTO DOS MICROSSATÉLITES	28
5.4.1. CLIVAGEM	29
5.4.2. LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES	30
5.4.3. CLONAGEM	31
5.5. TRIAGEM DOS LOCOS MICROSSATÉLITES	33
5.6. ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES	33

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	38
6.1. EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO DNA _____	38
6.2. BIBLIOTECA ENRIQUECIDA COM MICROSSATÉLITE _____	38
6.3. CLONAGEM E ISOLAMENTO DOS MICROSSATÉLITES _____	41
6.4. TRIAGEM DOS LOCOS MICROSSATÉLITES _____	46
6.5. ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES _____	52
6.6. TESTANDO OS INICIADORES EM UMA POPULAÇÃO _____	57
7. CONCLUSÃO _____	72
8. REFERÊNCIAS _____	74
9. ANEXOS _____	97
9.1 RESUMO DOS RESULTADOS _____	97
9.2 SOLUÇÕES _____	98
9.3 ARTIGO CIENTÍFICO _____	103

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Exemplar de <i>Akodon montensis</i> _____	09
FIGURA 2	Distribuição de <i>Akodon montensis</i> _____	10
FIGURA 3	Cariótipo padrão de <i>Akodon montensis</i> _____	11
FIGURA 4	Visualização da Floresta Nacional de São Francisco de Paula_	25
FIGURA 5	Demonstração da qualificação da extração de DNA em gel de agarose 0,8%_____	28
FIGURA 6	Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem_____	36
FIGURA 7	Placa de sonda GATA mostrando as inúmeras colônias encontradas _____	42
FIGURA 8	Demonstração do plaqueamento réplica_____	43
FIGURA 9	Verificação em gel de agarose 0,8% de alguns plasmídeos extraídos_____	42
FIGURA 10	Gel de agarose mostrando o sucesso de amplificação via PCR dos plasmídeos extraídos com sonda GT_____	44
FIGURA 11	Gel de agarose mostrando o sucesso de amplificação via PCR dos plasmídeos extraídos com sonda GATA_____	44
FIGURA 12	Exemplo de um arquivo de sequenciamento do plasmídeo enviado pela MacroGen e a região microssatélite em aumento_____	45
FIGURA 13	Arquivo txt. de sequenciamento e representação em cores de como encontrar a região de interesse, no caso, o DNA de <i>Akodon montensis</i> dentro do material genético do vetor_____	47
FIGURA 14	Demonstração de um arquivo de alinhamento correto entre	

	as duas fitas sequenciadas, gerado no programa Mega 5.1 beta_____	48
FIGURA 15	Análise de semelhança dos clones no programa ClustalW, 100% de semelhança (score) entre os clones 1.4 e 1.18_____	49
FIGURA 16	Resultado do desenho dos iniciadores, bem como tamanho esperado do fragmento e temperatura média de anelamento_____	49
FIGURA 17	Gel de poliacrilamida 8% mostrando o sucesso de amplificação para os iniciadores 4, 5 e 6_____	54
FIGURA 18	Gel de poliacrilamida 8% mostrando o sucesso de amplificação para os iniciadores 7, 8 e 9_____	55
FIGURA 19	Gel de poliacrilamida 8% mostrando o sucesso de amplificação para os iniciadores 10, 11 e 12_____	55
FIGURA 20	Gel de poliacrilamida 8% mostrando o sucesso de amplificação para os iniciadores 13 e 14_____	56
FIGURA 21	Gel de poliacrilamida 8% não desnaturante para a visualização do sucesso de amplificação dos iniciadores_____	57
FIGURA 22	Demonstração de picos gerados pelo programa Fragment Profiler_____	58
FIGURA 23	Excesso de picos, impossibilitando a interpretação dos dados e análise das sequências em Akomm 5 e Akom 6_____	59
GRÁFICO 1	Representação do polimorfismo encontrado por lócus na população estudada_____	61

FIGURA 24	Valores de heterozigosidades observada e esperada geradas no programa GDA, antes da detecção de alelos nulos _____	62
FIGURA 25	Valores do equilíbrio de Hardy Weinberg gerados no programa GDA, antes da detecção de alelos nulos _____	63
FIGURA 26	Dados gerados no programa microchecker para avaliar presença e ausência de alelos nulos em cada locos_____	64
FIGURA 27	Valores de heterozigosidade observada e esperada geradas no programa GDA, após a detecção de alelos nulos_____	65
FIGURA 28	Valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg gerados no programa GDA, após a detecção de alelos nulos _____	66
FIGURA 29	Valores encontrados para a estatística F de Whight (<i>F_{is}</i>)_____	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Reagentes e Volume em microlitros (μ l) do mix da clivagem____	29
TABELA 2	Reagentes e volume em microlitros (μ l) do mix para ligação dos adaptadores_____	30
TABELA 3	Condições da PCR para amplificação da simples fita de DNA capturado com sequências repetidas_____	31
TABELA 4	Informações dos quinze iniciadores selecionados para Síntese_____	49
TABELA 5	Condições da Reação em Cadeia da Polimerase_____	52
TABELA 6	Ciclos da PCR. 1° etapa de anelamento do iniciador específico e a 2° etapa de anelamento da fluorescência universal_____	52
TABELA 7	Tamanho e frequência dos alelos encontrados para cada iniciador_____	60
TABELA 8	Número gerado pelo programa MicroChecker, para os homozigotos observado e esperado em cada locos_____	66
TABELA 9	Valores do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) por locos _____	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – microlitro.

cm – centímetros.

m – metros.

g – gramas.

kg – kilogramas.

ml – mililitros.

DNA – ácido desoxirribonucleico.

PCR – Reação em cadeia da Polimerase.

rpm – Rotações por minuto.

mA – Miliampére.

V – voltagem.

°C – graus Celsius.

h – horas.

ng – nanograma.

UV – ultra violeta.

M – molar

pb – pares de bases.

A – Adenina.

T – Timina.

C – Citosina.

G – Guanina.

MM – marcador molecular (ladder).

He – heterozigosidade esperada.

Ho – Heterozigosidade observada.

H0 – Hipótese Nula.

GDA – Genetic data Analyses Software.

PIC – conteúdo de informação polimórfica.

FLONA-SP – Floresta Nacional de São Francisco de São Francisco de Paula.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Natureza.

F – coeficiente de endogamia.

ONG – Organização não governamental.

1 INTRODUÇÃO

A genética da conservação é a área da Biologia que utiliza ferramentas genéticas para analisar a diversidade gênica das populações e ajudar na conservação das espécies. Já é reconhecido por ONGs, inclusive a IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza, o principal grupo de conservação Internacional - a importância e a necessidade de conservar a diversidade genética para que as espécies possam continuar a evoluir e consequentemente reduzir a probabilidade de extinção, mantendo assim a biodiversidade do planeta.

A biodiversidade está sendo rapidamente esgotada devido a consequências diretas e indiretas das atividades humanas, como a destruição de habitats e fragmentação, através da exploração, poluição, introdução de espécies exóticas, além de eventos estocásticos, demográficos, ambientais, genéticos e catastróficos.

A diversidade genética é o material bruto sobre a qual a seleção natural atua, permitindo a adaptação dos organismos à possíveis mudanças ambientais. A perda desta diversidade reduz o potencial evolutivo e também é responsável pela redução do sucesso reprodutivo.

Para análise da diversidade genética, geralmente, são utilizados como dado: o polimorfismo; a heterozigosidade média e a diversidade alélica. Para estimar a heterozigosidade é necessário a utilização de um marcador molecular co-dominante que permita a observação tanto de indivíduos heterozigotos como homozigotos dentro do estudo de uma população. Os marcadores co-dominantes mais utilizado para estudos de população e conservação são os

microssatélites, que apresentam uma alta taxa de polimorfismo, são encontrados frequentemente em eucariontes e vêm sendo conservados no genoma ao longo das espécies.

Para a utilização dos marcadores microssatélites é essencial o conhecimento do genoma da espécie a ser estudada, para identificação de sequências satélites repetidas e o desenvolvimento de iniciadores que irão permitir o sucesso do estudo no grupo de interesse do pesquisador. (em vão, pq não é essencial conhecer o genoma, escolhemos as sondas por estudos anteriores).

Como relatado pela IUCN, a espécie *Akodon montensis* apesar de não sofrer grandes ameaças de extinção, já tem seu número populacional reduzido devido a fragmentação de seu habitat natural. Como a genética da conservação visa a manutenção de populações através da análise do *pool* gênico avaliado por marcadores molecular microssatélite, este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar iniciadores microssatélite para a espécie em questão, pensando em estudos populacionais e preservação destes roedores.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 TAXONOMIA

A ordem Rodentia é a mais numerosa dentro da classe Mammalia, nela existem cerca de 2.277 espécies viventes, o que perfaz aproximadamente 42% dos mamíferos do mundo (MUSSER & CARLETON, 2005). No Brasil, há registros de aproximadamente 236 espécies, distribuídas em 74 gêneros, sendo que no Paraná os representantes desta ordem correspondem a 40% dos mamíferos existentes neste estado (REIS *et. al.*, 2006). Na América do Sul correspondem a 45% das espécies de mamíferos viventes (NOWAK, 1999).

As espécies que constituem essa ordem compartilham uma característica diferencial, sua dentição altamente especializada para roer. Todos os roedores possuem um par de incisivos na arcada dentária superior e inferior seguidos por um espaço, o diastema, e por um ou mais molares e pré-molares. Os roedores não possuem mais de quatro incisivos e nenhum roedor possui caninos. Seus incisivos não têm raiz e não são cobertos por esmalte, sendo assim, crescem continuamente e são desgastados no ato de roer, devido ao atrito e desgaste da dentina, o que mantém os dentes bastante afiados. Esse sistema de "afiamento" é muito eficiente e é uma das chaves do enorme sucesso dos roedores (MUSSER & CARLETON, 2005).

São animais evolutivamente bem adaptados, estando presentes em praticamente todos os tipos de nichos, podendo ser encontrados nos mais diversos tipos de clima, desde os mais quentes e desérticos, passando por regiões tropicais e chegando aos limites mais frios, apesar de não serem

observado no Continente Antártico. Estão adaptados a grandes altitudes, conferindo assim uma ocorrência desde litorânea até montanhosa. As espécies de roedores também adquiriram adaptações diversas para sua sobrevivência, podendo assim ser: terrestres, arborícolas, fossoriais, saltatórios (formas de desertos) ou semi-aquáticos, mas não existem formas marinhas (NOWAK & PARADISO, 1983; SARAGE & LONG, 1986). O grande sucesso das radiações adaptativas conquistadas por esta ordem deve-se à ampla variedade de hábitos de alimentação que, predominantemente herbívora, lança mão de outras fontes de alimento, podendo ser insetívoras, piscívoras, carnívoras ou onívoras (LANDRY JUNIOR, 1970).

Esta ordem apresenta uma diversidade de tamanho bem marcante, sendo normalmente pequenos quando comparados com outras ordens da classe Mammalia (LINNAEUS, 1758). A maior espécie desta ordem é representada pela capivara, *Hydrochaeris hydrochaeris*, podendo chegar a 1,3 m de altura e pesar 50 Kg. Já as menores espécies são representadas pela Família Muridae, onde seus exemplares apresentam tamanho corporal de até 10 cm e peso igual ou inferior a 15 g (EISENBERG, 1989). Além da ampla diversidade de tamanho, a diversidade morfológica observada nesta ordem é a causa de muita polêmica entre os taxonomistas (VAUGHAN, 1978), onde várias propostas de classificação têm sido apresentadas, destacando-se as de Simpson (1945), Wood (1955;1965), Anderson & Jones (1967), Mckenna (1975), Chaline; Mein & Petter (1977), Reig (1981) e Musser & Carleton (1993;2005).

Em 2000, Patterson publicou uma nova lista de mamíferos para a América do Sul – exceto Guiana, Bolívia e Paraguai – desde a última

publicação em 1992, onde sete novos gêneros e 57 novas espécies foram descritas em seis Ordens (Didelphimorphia – três espécies, Paucituberculata - uma, Insectivora – três, Chiroptera – nove, Primates - seis e Rodentia - 35). Destas, 60% são espécies novas de roedores, sendo que 38% são da Família Muridae (Subfamília Sigmodontinae) distribuídas em cinco Tribos: nove em Akodontinos; seis em Oryzomyinos; três em Phyllotinos; duas em Thomasomyinos; uma em Ichthyomyino e também a atribuição do gênero *Punomys* considerado *Incertae sedis* (STEPAN, 1999), sendo que sete gêneros novos são propostos para a Subfamília Sigmodontinae: três Oryzomyini; dois Akodontini e dois Phyllotini.

Dentro da subfamília Sigmodontinae, pertencente à Família Muridae destaca-se a tribo Akodontini - uma das mais numerosas, composta por 19 gêneros e 105 espécies (MUSSER & CARLETON, 2005). São caracterizados por sua forma semelhante ao rato, com hábitos que variam de onívoros a insetívoros (REIG, 1981, 1984).

A tribo apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo que a maior parte de seus gêneros e espécies está concentrada nas regiões mais centrais da Cordilheira dos Andes, que é proposta como sendo a área original de diferenciação dos akodontinos (REIG 1984, 1987). Muitos autores sugerem que esta tribo seja monofilética e evolutivamente derivada de um estoque Oryzomino primitivo (GARDNER & PATTON, 1976; BIANCHI *et. al.*, 1971; REIG 1977, 1984).

Liascovich e Reig (1989) propõem três frentes de radiação a partir do centro protopuma de origem das espécies de akodontinos, principalmente o gênero *Akodon* que se dispersaram pela América do Sul. Uma linhagem Sul

teria diversificado ao longo do Sul dos Andes com poucas alterações cariotípicas em relação ao $2n = 52$ ancestral. A linhagem Norte teria sofrido uma redução do número diplóide, culminando no $2n = 18$ de *A. urichi* da Venezuela, diversificado ao longo dos Andes Central e Norte. A maior radiação seria a Centro-Sul, ao longo do Chaco e Pampas, que teria originado os cariótipos com $2n = 40$ a 44 , que foram gradativamente reduzidos por eventos de fusão, dando origem aos cariótipos com $2n = 24$, 16 e 14 , observados no Nordeste e Centro-Sul do Brasil.

Dados de análises cladísticas baseadas em seqüências de DNA nuclear e mitocondrial, em roedores sigmodontinos, corroboram a condição monofilética dos akodontinos (D'ELÍA, 2003). Os dados deste autor refutam, porém, a hipótese de que os akodontinos tenham evoluído a partir de um estoque oryzomino e que posteriormente originou os filotinos, já que os dados cladísticos sugerem que os filotinos e oryzominos sejam distantemente relacionados com os akodontinos.

As espécies de *Akodon*, também conhecidas como ratos-do-chão, possuem hábito terrestre, galerícolas ou subterrâneos. Sua alimentação é do tipo insetívoras-onívoras (GRAIPEL *et. al.*, 2003), sendo que artrópodes e sementes também fazem parte de sua dieta (SOUSA; LANGGUTH & GIMENEZ, 2004). Habitam formações florestais, áreas abertas adjacentes e campos de altitude ao longo de toda a Mata Atlântica, Campos do Sul, áreas florestais da Caatinga, e formações vegetais abertas e fechadas do Cerrado. É o gênero mais numeroso com 45 espécies. Está amplamente distribuída pela América do Sul, principalmente no Brasil (Pernambuco, Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa

Catarina e Rio Grande do Sul), e em regiões fronteiriças da Argentina, do Paraguai, do Chile, da Venezuela e do Uruguai (MUSSER & CARLETON, 2005).

Os membros de *Akodon* têm tamanho pequeno, orelhas grandes, e cauda pouco menor do que o comprimento do corpo (MYERS & PATTON, 1989; HERSHKOVITZ, 1990; CHRISTOFF, 1997; HERSHKOVITZ, 1998; CHRISTOFF *et. al.*, 2000; PARDIÑAS *et. al.*, 2003; BONVICINO; OLIVEIRA & D'ANDREA, 2008). A pelagem do dorso varia do castanho-claro ao castanho-escuro, sem limite definido com a pelagem do ventre, que é cinza-amarelada ou cinza-esbranquiçada, sendo as bases dos pêlos acinzentadas. As orelhas são pouco pilosas e a superfície superior das patas é clara. A cauda também é pouco pilosa, com escamas epidérmicas aparentes (BONVICINO; OLIVEIRA & D'ANDREA, 2008). Unhas normais para o grupo, mas variáveis em tamanho. As mamas estão dispostas em duas fileiras compostas por quatro mamas cada. Crânio com região interorbital e caixa craniana estreita (GYLDENSTOLPE, 1932).

É um gênero que apresenta uma taxonomia muito complexa e pouco compreendida em relação aos demais roedores, por incluir espécies com grau morfológico de similaridade maior que nos demais gêneros. A similaridade fenotípica encontrada em várias de suas espécies, que é uma característica importante neste gênero e acarreta problemas taxonômicos, contrasta com sua ampla multiformidade cariotípica (SBALQUEIRO, 1989; CHRISTOFF *et. al.*, 2000). Assim, observa-se uma grande variação tanto no número diplóide, $2n = 10$ (SILVA & YONENAGA-YASSUDA, 1998) a 46 cromossomos (SBALQUEIRO, 1989), como no número de braços dos cromossomos

autossômicos (NA = 14 - 16 a 46). Uma característica do gênero é a presença de um pequeno par de cromossomos metacêntricos (BIANCHI *et. al.*, 1971).

Esta variação cariotípica tem sua maior expressividade na espécie *Akodon cursor*, com $2n = 14, 15$ e 16 cromossomos, ocorrendo desde Pernambuco ($2n = 16$) até o Paraná ($2n = 14$ a 16) (SBALQUEIRO & NASCIMENTO, 1996). Para verificar a possível variação genética nesta espécie Nogueira & Fagundes (2005) analisaram polimorfismos de fragmentos de restrição do gene citocromo b em 50 exemplares de Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e São Paulo, o que resultou em 13 haplótipos. A partir da análise conjunta dos haplótipos do gene citocromo b e de dados cariotípicos, foram identificados agrupamentos entre os indivíduos das populações do Nordeste em relação às do Sul-Sudeste. Mesmo com a formação desses agrupamentos, em ambos os clados todas as formas cariotípicas foram encontradas, verificando-se apenas uma maior porcentagem da forma $2n = 16$ no Nordeste e menor no Sul-Sudeste, enquanto que a forma $2n = 14$ apresentou-se abundante na região Sul-Sudeste e ausente na Nordeste (NOGUEIRA & FAGUNDES, 2005).

Descrita em 1913 por Thomas, a espécie *Akodon montensis* (Figura 1) foi por muitos tempo considerado como sinônimo junior de *Akodon cursor*, devido a sua grande semelhança morfológica tegumentar, dentária e craniana (XIMENES & LANGGUTH, 1970). Esse erro de identificação foi um problema na taxonomia das espécies atlânticas e só foi resolvido com estudos citogenéticos, pela diferença de cariótipo existente entre eles – *Akodon cursor* $2n = 14 - 16$ e *Akodon montensis* $2n = 24 - 26$ (SILVA; PATTON & YONENAGA - YASSUDA, 2006).

Figura 1: Exemplar de *Akodon montensis* (Fonte: www.animaldiversity.ummz.umich.edu)

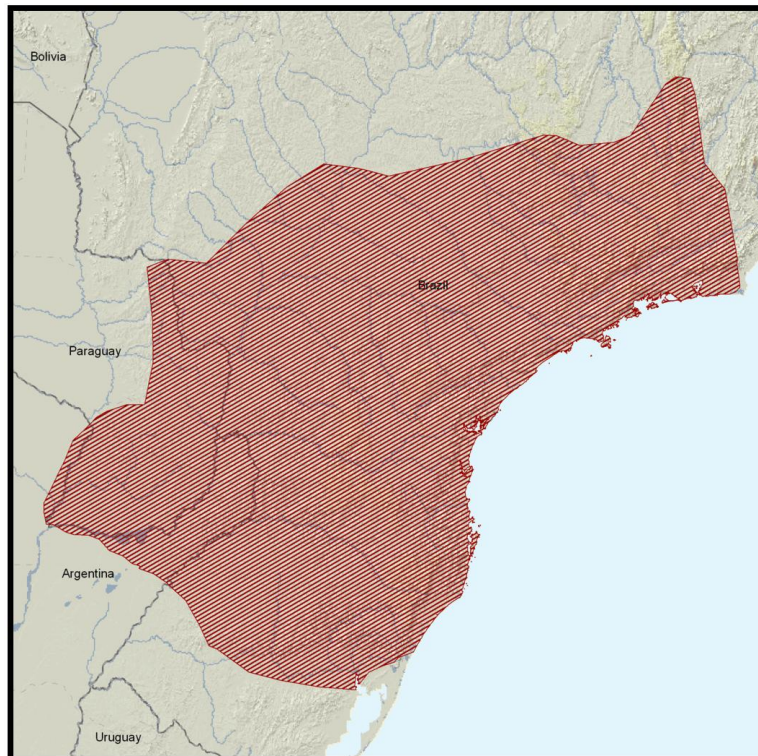


Esta espécie habita Mata de Galerias ao longo de riachos e córregos em regiões de Mata Atlântica e Cerrados (PARDINÃS *et. al.*, 2003). São distribuídos no Sul da América do Sul sendo observadas do Leste ao Sul do Paraguai (GAMARRA DE FOX & MARTIN, 1996), no Nordeste da Argentina (PARDINÃS *et. al.*, 2003), no Sudeste e Leste do Brasil - que vai do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro (Figura 2) (CRISTOFF 1997; FAGUNDES, 1993, LIASCOVICH & REIG 1989, RIEGER; LANGGUTH & WEIMER, 1995), incluindo as configurações de Mata Ciliar em Minas Gerais e Goiás (GEISE; SMITH & PATTON, 2001; RIEGER; LANGGUTH & WEIMER, 1995). Além de que no Brasil esta espécie já foi observada em regiões costeiras (PARDINAS *et. al.*, 2008).

Apresenta hábito alimentar preferencialmente frugívoro, porém não exclusivo. Sua alimentação frugívora aumenta seu potencial da espécie como dispersores, pois além de armazenarem sementes para consumo posterior - deslocando as mesmas para lugares distantes de onde foram coletadas - foi

observado que parte das sementes consumidas por *A. montensis* permanece intacta e viável em seus excrementos, tendo sucesso de germinação e consequente colaboração para a manutenção das florestas (HORN; KINDEL & HARTZ, 2008).

Figura 2: Distribuição de *Akodon montensis* (Fonte: www.iucn.org).

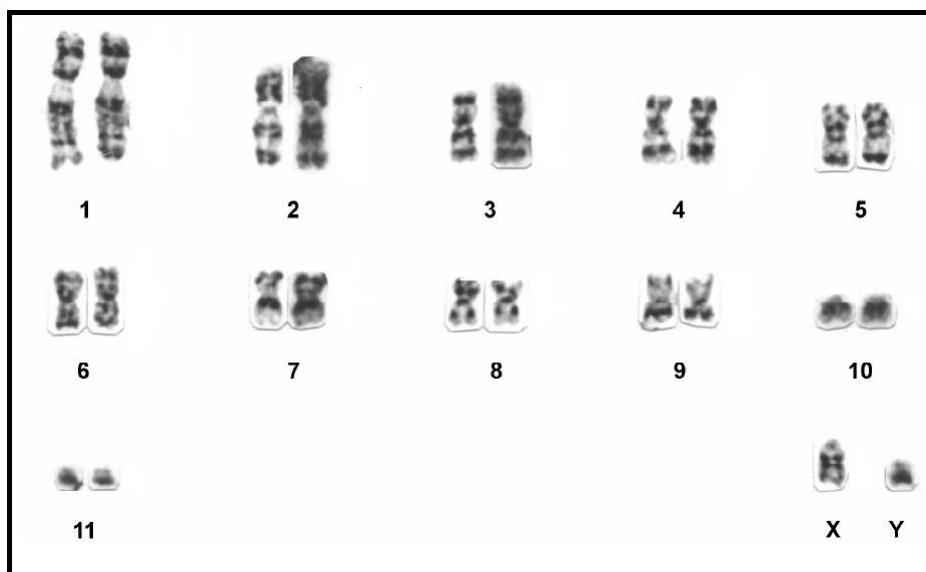


O padrão de atividades é bicrepuscular com maior atividade no início e final da noite. O período de gestação destes animais varia de 21 a 30 dias e logo após a fêmea dar a cria, ela está apta para novo acasalamento. Apresentam um número de crias que varia de três a sete (GENTIL; D'ANDREA & CERQUEIRA, 1997).

A União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN) informa pela Red List (www.iucn.org) que apesar de não existirem grandes ameaças para *A.*

montensis, esta espécie tem tido um declínio populacional nas regiões de Mata Atlântica devido ao efeito de destruição do habitat. A diversidade de *A. montensis* muitas vezes pode ser subjugada, pois sua morfologia semelhante a outras espécies da tribo Akodontini, só permite correta identificação através de um método eficiente. Tal método inclui a utilização do cariótipo, que para a espécie em questão varia em $2n = 24, 25$ ou 26 , sendo que o cariótipo padrão é $2n=24$ (figura 3), e as variações $2n=25$ e $2n=26$ ocorrem devido à presença de cromossomos supranumerários, conhecidos como cromossomos B (FAGUNDES & YONENAGA-YASSUDA, 1998).

Figura 3: Cariótipo padrão da espécie *Akodon montensis* (fonte: Hass, 2006).



Assim, a espécie *A. montensis* serve como um ótimo modelo animal para estudos moleculares, devido a sua grande importância ecológica, principalmente como dispersores de semente, quanto como indicadores da qualidade ambiental.

2.2 A GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

A base da diversidade biológica é a variabilidade genética, sem a qual a sobrevivência das populações e das espécies ao longo do tempo seria difícil. O estudo da variabilidade genética expressa as diferenças existentes entre as populações das espécies, fornecendo ferramenta essencial, que combinada com estudos da ecologia e sistemática auxiliam no entendimento da sustentabilidade das mesmas, bem como as populações que as constituem (AVISE, 1994).

A genética da conservação começou a tomar força no início da década de 1980 (SOULÉ & WILCOX, 1980) e tem como objetivo principal o estudo da biodiversidade molecular das populações biológicas que sofreram algum impacto antrópico (SOLÉ-CAVA, 2001). Esta biodiversidade é importante para a preservação das espécies, pois dará a elas a capacidade de evoluírem e adaptarem-se às mudanças ambientais (FRANKHAM; BALLOU & BRISCOE, 2004). A fragmentação florestal é um dos principais efeitos antrópicos, bastante importante em regiões urbanas, pois forma ilhas verdes separadas por área urbanizada. Deste modo, a população original é sub-dividida em diversas pequenas populações, que contêm apenas parte da variabilidade genética da população original (MEFFE, 1987).

Se estiverem totalmente isoladas, a falta de conexão entre as populações levaria a ausência do fluxo gênico e as mesmas estariam sujeitas aos efeitos do endocruzamentos e deriva genética, tendo como consequência a perda da biodiversidade molecular. No entanto, pode ser que não ocorra o isolamento total entre as populações, formando uma metapopulação

constituída pelo conjunto das pequenas populações, entre as quais existe fluxo gênico (HEDRICK, 2001). Estudos mostram que a redução do fluxo gênico, em populações isoladas e de tamanho moderado, está associada com a redução da viabilidade e fecundidade dos indivíduos, podendo, em longo prazo, levar a população à extinção. Isso se deve a fixação de alelos deletérios, como consequência do endocruzamento e da baixa variabilidade genética dentro da população (COUVET, 2001).

Uma variedade de estudos, utilizando a ecologia molecular tem sido realizados, trazendo resultados importantes para a compreensão da biologia de diversos grupos. Para estes estudos uma série de técnicas que utilizam marcadores genéticos - que podem ser baseados em proteínas, enzimas ou segmentos específicos de DNA - apresentam variabilidade, tanto individual, populacional, específica, como nos níveis taxonômicos superiores. Uma vez definida a espécie e a população a ser estudada, seja para repovoamento de uma área ou para monitoramento de populações locais, são escolhidos os marcadores genéticos e a metodologia mais adequada para as análises moleculares (AVISE, 1994).

Existem diversos critérios científicos e não científicos para a escolha de marcadores moleculares adequados. Entre os critérios científicos está a escolha de um marcador molecular que seja adequado para detectar a variabilidade genética necessária para o cumprimento do objetivo do trabalho. Outro critério importante é o tipo de material disponível para estudo, pois, dependendo da espécie torna-se impraticável a obtenção de grande quantidade de material biológico. Entre os critérios não científicos, está o modismo, pois técnicas mais “modernas” ou “sofisticadas” podem ser

consideradas melhores e de financiamento facilitado, do que técnicas mais antigas, mesmo quando oferecem o mesmo tipo de resultados. Outro aspecto não científico muito importante é o custo, principalmente em estudos populacionais que envolvem um número amostral muito grande. Devemos, portanto, escolher de modo adequado entre técnicas igualmente informativas, mas com custos diferenciados (SOLÉ-CAVA, 2001).

O uso de marcadores moleculares no campo da Conservação tem sido extremamente utilizado, sendo em grande parte responsável pela possibilidade de estudar populações ameaçadas em condições naturais (EIZIRIK, 1996).

2.3 OS MICROSSATÉLITES

A genotipagem de marcadores moleculares pode ser utilizada para estimar os parâmetros que permitam inferir a história evolutiva, estrutura populacional e ocorrência de fluxo gênico em populações naturais. Dentre esses marcadores, um dos mais utilizados são os locos de DNA microssatélite (SELKOE & TOONEN, 2006; SUNNUCKS, 2000), os quais são amplamente aplicados em estudos populacionais e ecológicos para estimar parâmetros como estrutura populacional, taxa de migração, tamanho populacional efetivo, ocorrência de flutuações no tamanho populacional e grau de parentesco (OLIVEIRA *et. al.*, 2006).

O DNA satélite foi descoberto em 1960, quando submetido a centrifugação em um gradiente de densidade, apresentou duas ou mais camadas e uma banda principal contendo genes e bandas secundárias, que

foram chamadas de bandas satélites. As bandas satélites foram identificadas como sequências de DNA repetidas e longas (GRIFFITHS *et. al.*, 2000)

No fim dos anos 80, os microssatélites, também denominados SSR ("Simple Sequence Repeats"), foram isolados e descritos por quatro grupos de cientistas como marcadores moleculares co-dominantes formados por sequências repetidas de um a seis pares de bases (pb) de comprimento dispostas em *tandem* (LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989; TAUTZ, 1989; JACOB *et. al.*, 1991).

Os microssatélites são encontrados em alta frequência e com ampla distribuição no genoma de eucariotos (TÓTH; GÁSPARI & JURKA, 2000), sendo que muitos de seus locos estão localizados entre genes ou dentro de íntrons (ENGEL *et. al.* 1996). Tornaram-se populares por se mostrarem ferramentas moleculares extremamente versáteis, tendo aplicações variáveis, que partem desde sua utilização como marcadores moleculares para segmentos cromossômicos, passando por identificação de indivíduos, até o rastreamento da história biológica de populações (CHAMBER & MACAVOY, 2000).

São marcadores altamente polimórficos, pois apresentam uma alta taxa de mutação por loco por geração. Dois modelos foram propostos para explicar esta instabilidade dos microssatélites; 1. Alta taxa de *crossing-over* desigual entre cromossomos homólogos imperfeitamente alinhados ao longo das repetições satélites; 2. Deslizamento da DNA polimerase durante o processo de replicação, adicionando ou removendo repetições (EISEN, 1999; SCHLÖTTERER & TAUTZ, 1992). O segundo modelo tem sido mais aceito e amplamente citado na literatura, porém nem todo deslizamento durante a

replicação torna-se mutação, pois alguns são corrigidos por mecanismos de reparo de DNA (EISEN, 1999).

Os mecanismos de deslizamento durante a replicação podem gerar aumento ou decréscimo no número de repetições, porém muitos estudos mostram maiores evidências para um aumento no número de unidades repetidas (AMOS *et. al.*, 1996; PRIMMER *et. al.*, 1996; ELLEGREN, 2000). Cada seguimento de tamanho diferente representa um alelo diferente de um mesmo loco. Essa contagem se refere ao número de repetições de pares de bases encontradas na sequência gênica do loco (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Devido à grande variabilidade no número de repetições da maioria dos locos, os microssatélites são amplamente usados em aplicações forenses, estudos genéticos de populações, mapeamento genético e físico de genomas e, conseqüentemente, têm se tornado o suporte principal de análises genômicas em diferentes organismos (RUBINSZTEIN *et. al.*, 1995; FRANKHAM; BALLOU & BRISCOE, 2004).

Outro atributo de grande importância desse marcador molecular é a sua transferibilidade: iniciadores desenvolvidos para uma espécie em especial, mas que apresentam amplificação dentro de um mesmo gênero, família ou ordem, são denominados iniciadores heterólogos. O sucesso na amplificação deve-se à conservação de sítios microssatélites entre espécies relacionadas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998, SELKOE & TOONEN, 2006; OLIVEIRA *et. al.*, 2006).

Por serem marcadores co-dominantes, quando o produto de amplificação é submetido à corrida eletroforética, pode-se diferenciar os

indivíduos homozigotos dos heterozigotos. Essa característica do marcador é importante para análise tendo em vista que para chegar a conclusões sobre uma população é necessário conhecer o *pool gênico* dos indivíduos que a compõem. A utilização dos microssatélites aumentou significativamente em estudos sobre comparações da variabilidade genética entre espécies e populações, história evolutiva e estrutura populacional (ENGEL *et. al.*, 1996; GEMMELL *et. al.*, 1997; GONGORA *et. al.*, 2002).

São marcadores simples de ser usados, requerem pouca quantidade e baixa qualidade do DNA, podem ser trocados entre pesquisadores ou centros de pesquisas e quando comparados a outros marcadores, apresentam o mais alto conteúdo informativo (POWELL; MACHRAY & PROVAN, 1996).

(faltou uma ligação).

Para o enriquecimento de biblioteca de microssatélites, uma nova técnica baseada em sondas químicas tem sido utilizada e seus resultados tem apresentado sucesso satisfatório. Neste método, esferas magnéticas revestidas por estreptavidina são utilizadas para reconhecer as sondas microssatélites marcadas com biotina, ligadas a fragmentos de DNA genômico. É uma técnica vantajosa, pois além de não utilizar sondas radioativas - que causam em longo prazo malefícios a saúde de quem as usa - tem sido altamente eficiente, sendo utilizada para o desenvolvimento de microssatélites em animais e plantas (GLENN & SCHABLE, 1995; REFSETH *et. al.* 1997; ZANE, BARGELLONI & PATARNELLO, 2002; LU *et. al.*, 2005; SUN, LU & LIANG, 2005; XIN *et. al.*, 2008; RORATTO, BARTHOLOMEI-SANTOS & FREITAS, 2011).

2.4 A CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS GENÔMICAS

De acordo com Nascimento e colaboradores (2003) até o início da década de 70 o material genético dos organismos era o componente químico mais difícil de ser analisado. Mas ocorreu uma revolução na ciência entre os anos 1971 e 1973, quando começaram a surgir as primeiras técnicas de isolamento e purificação de genes específicos, através do processo de clonagem gênica. Essa técnica hoje conhecida como Tecnologia de DNA Recombinante, permitiu o sucesso em experimentos que previamente eram impossíveis de ser realizados, levando a um avanço muito grande na área da genética.

O desenvolvimento desta nova tecnologia só foi possível pela descoberta, no final dos anos 1960, das enzimas de restrição, que atuam como uma espécie de "tesoura biológica" reconhecendo determinadas sequências nucleotídicas e cortando-as em sua ligação açúcar-fosfato em ambos os filamentos da molécula de DNA, produzindo então fragmentos de tamanhos diversos. Estas enzimas são produzidas naturalmente por bactérias, que as utilizam como forma de defesa contra infecção viral, onde clivam em diversos fragmentos o material genético dos vírus, impedindo assim, sua reprodução na célula bacteriana. Cada enzima reconhece sequências específicas no DNA, sequências estas que também são encontradas no genoma da bactéria, porém são protegidas da clivagem pelo processo de metilação (ALBERTS *et. al.*, 2002). Segundo Nascimento e colaboradores (2003), existem mais de 1000 enzimas de restrição identificadas e isoladas de bactérias, sendo classificadas conforme sua estrutura, atividade e sítios de reconhecimento e clivagem.

Existem três classes de enzimas de restrição: I, II e III, sendo que a maioria utilizada nas pesquisas atuais são as do tipo II, pois têm um modo de ação mais simples (KOVALL & MATTHEWS, 1999). Estas enzimas são chamadas de endonucleases e cortam uma posição interna da cadeia de DNA, ao invés de iniciar a sua degradação a partir de uma das pontas. Assim, a designação mais correta destas enzimas é endonucleases de restrição do tipo II, embora muitas vezes sejam simplesmente designadas como enzimas de restrição (NICHOLL, 2002).

Para construir uma molécula híbrida, os fragmentos - obtidos a partir do tratamento de DNA de interesse com enzimas de restrição - são unidos a uma molécula, denominada vetor, que é capaz de se reproduzir no interior de uma célula bacteriana. Assim os fragmentos do DNA de interesse depois de ligados definitivamente ao vetor pela enzima DNA-ligase, resultam em uma molécula de DNA recombinante. A célula hospedeira compatível, que adquiriu a molécula de DNA recombinante pelo processo de transformação bacteriana, passa a ser chamada de transformante ou célula transformada. Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular – mitose – e produz um grande número de células idênticas – clones – que contêm milhares de cópias do DNA recombinante (BROW, 2003; MICKOLS, FREYER & CROTTY, 2006).

Devido à riqueza de informações disponíveis a respeito da microbiologia, bioquímica e genética da bactéria *Escherichia coli*, esta é considerada o organismo hospedeiro modelo para a maioria de vetores de clonagem existentes (GLICK & PASTERNAK, 1998). Os vetores de clonagem mais simples e mais utilizados são os baseados em pequenas moléculas de DNA

circular adicional presentes em algumas bactérias, os plasmídeos. Um plasmídeo para ser considerado um bom vetor de clonagem deve apresentar:

1. Uma origem de replicação;
2. Dois ou mais sítios únicos de clivagem para endonucleases de restrição e
3. Um gene que codifica um produto que distingue a célula transformada da célula não transformada, como por exemplo, o gene que confere resistência à ampicilina.

No procedimento são usados como vetores apenas plasmídeos que portam um ou mais genes marcadores de resistência a antibióticos, assim, as bactérias transformadas com o plasmídeo vetor recombinante quando cultivadas em um meio seletivo, sobrevivem e crescem, enquanto que as células não transformadas acabam morrendo. No cultivo, cada molécula híbrida resultará em uma população de bactérias, assim o fragmento de DNA de interesse foi clonado em várias cópias, cada cópia dentro de cada bactéria da cultura obtida (BROW, 2003; MICKOLS, FREYER & CROTTY, 2006; GLICK & PASTERNAK, 1998).

O processo de clonagem molecular compreende as seguintes etapas: 1. Clivagem do DNA com enzimas de restrição; 2. União dos fragmentos a vetores para formação do DNA recombinante; 3. Introdução da molécula recombinante no organismo hospedeiro compatível e 4. Proliferação do mesmo em meio de cultura devido ao processo de divisão celular. Uma das mais importantes aplicações da clonagem é a possibilidade de se obter fragmentos de DNA de todo o genoma de um determinado organismo, o que constitui a chamada biblioteca genômica (BROW, 2003; MICKOLS, FREYER & CROTTY, 2006).

A tecnologia do DNA recombinante tem uma aplicação ampla, podendo ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica,

determinando as sequências de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou para desenvolver culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis tais como a insulina humana, hormônios de crescimento, vacinas e enzimas industriais em grandes quantidades. Sua aplicação comercial e biotecnológica parece ter um potencial inesgotável. Como consequência do desenvolvimento desta tecnologia, atualmente é possível realizar investigações de paternidade e o diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas através da análise de DNA (BROW, 2003; MICKOLS, FREYER & CROTTY, 2006; GLICK & PASTERNAK, 1998).

Através do método de Biblioteca Genômica Enriquecida para microssatélites, descrevemos iniciadores para a espécie *Akodon montensis*, com a intenção de avaliar o potencial genético e a estrutura das populações; bem como inferir a história evolutiva e elaborar planos de manejo quando necessário, contribuindo assim para a conservação da espécie.

3 JUSTIFICATIVA

A utilização de marcadores microssatélites em análises genéticas vem crescendo significativamente devido às características favoráveis oferecidas por este marcador. Para o sucesso desta técnica, é necessário o desenvolvimento de iniciadores espécie-específica, através da identificação de regiões satélites no genoma do organismo de interesse e a publicação delas em bancos de dados, aumentando assim, as chamadas Bibliotecas Genômicas Enriquecidas com Microssatélites. O conhecimento gerado pela construção de iniciadores pode favorecer inúmeros grupos de pesquisa do mundo inteiro com interesse e/ou futuro interesse no estudo de populações da espécie em questões e/ou espécies próximas a ela taxonomicamente.

Para *Akodon montensis*, não foram observadas informações de sequências satélites em bancos de dados, dificultando assim o estudo de populações desta espécie. Exemplares vêm sendo coletados com alta frequência na região Sul do Brasil, por pesquisadores de diferentes Universidades, mostrando sua ampla distribuição nessa região. A fragmentação ambiental, coleta em áreas verdes distintas e pequenas, controle de coleta *versus* taxa de recaptura e dados da IUCN, levaram aos objetivos deste trabalho, com o intuito de obter uma ferramenta possível para elucidar problemas genéticos relacionados ao grupo em questão. Além de que é uma espécie ecologicamente importante por ser dispersora de sementes e colonizadora primária de áreas em recuperação.

Um bom marcador molecular, como o microssatélite, permite após sua caracterização, o desenvolvimento de inúmeros projetos referentes a genética

de populações, conservação e filogenia tanto para a espécie específica quando para espécies proximamente relacionadas devido a amplificação heteróloga destes iniciadores.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar regiões genômicas repetidas para desenvolver, otimizar e caracterizar marcadores microssatélites para a espécie de *Akodon montensis* utilizando a metodologia de Biblioteca Genômica Enriquecida.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

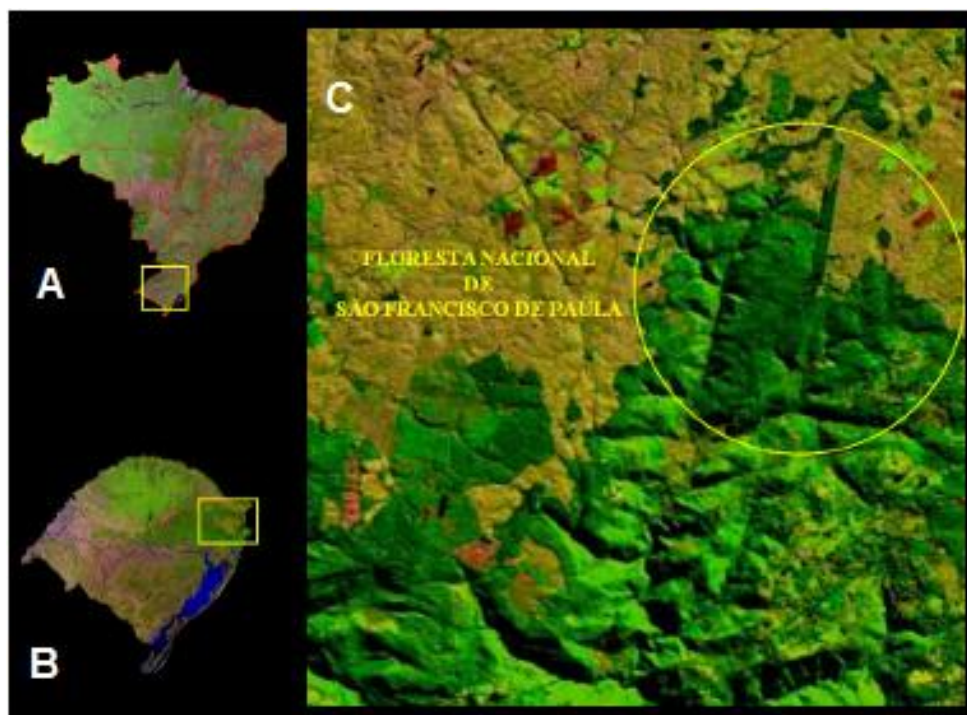
- Sequenciar parte do genoma de *Akodon montensis*, obtido através de clonagem;
- Identificar algumas regiões com unidades de repetição de nucleotídeos;
- Descrever a sequência dos iniciadores que flanqueiam as regiões de microssatélite;
- Testar a amplificação destes iniciadores via PCR em indivíduos de uma população da espécie *Akodon montensis*;
- Caracterizar os locos polimórficos e monomórficos evidenciados na população alvo;
- Analisar a variação dos locos de microssatélite em indivíduos *Akodon montensis* da população alvo;
- Verificar se os locos encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Analisar o poder discriminatório dos iniciadores desenhados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAS E ÁREA DE COLETA

As amostras utilizadas foram coletadas de janeiro de 2010 a fevereiro de 2011 em uma área de preservação ambiental que apresenta 1.606 hectares de mata e fica situada na cidade de São Francisco de Paula no Estado do Rio Grande do Sul, denominada FLONA-SFP (Floresta Nacional de São Francisco de Paula) (figura 4) e é mais uma área administrada pelo ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade).

Figura 4: Visualização da Floresta Nacional de São Francisco de Paula, local de coleta da espécie *Akodon montensis*, para realização dos testes dos iniciadores.



Legenda: (A) Localização da FLONA-SFP no mapa do Brasil; (B) Localização da FLONA-SFP dentro do estado do Rio Grande do Sul; (C) Foto satélite da FLONA-SFP.

Um total de 545 espécimes de *Akodon montensis* foram coletados nesse período de tempo e todos tiveram seu DNA extraído com o método CTAB. Um espécime foi utilizado para isolamentos dos iniciadores e testes de amplificação, enquanto que 24 espécimes foram utilizados para checagem de polimorfismo e inferência da estrutura populacional destes roedores nesta área.

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração de DNA foi realizada a partir de biopsia de músculo, de exemplares de *A. montensis*, armazenados em álcool 70% a -4°C no laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O protocolo de extração utilizado foi o descrito por Doyle & Doyle (1987), com modificações:

EXTRAÇÃO

1. Cortar um pedaço de tecido e amassá-lo em um pedaço de papel absorvente para retirar o máximo possível de álcool;
2. Colocar o tecido em um eppendorf 1,5µl;
3. Adicionar 500µl de CTAB e picar o tecido;
4. Adicionar 15µl de proteinase K;
5. Incubar em banho-maria a 60° até o tecido degradar.

LIMPEZA

1. Adicionar 500µl de clorofil (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1);
2. Mexer invertendo os tubos gentilmente por 2 minutos para misturar as soluções;
3. Centrifugar por 10 min a 13.200 rpm;

4. Transferir o sobrenadante para um tubo de 1,5µl.

PRECIPITAÇÃO

1. Adicionar 2/3 de etanol absoluto gelado ao sobrenadante final (300µl em geral);
2. Deixar precipitando por 2h a 4°C (pode deixar *overnight*);
3. Centrifugar por 25 minutos a 13.200 rpm;
4. Descartar gentilmente o sobrenadante;
5. Adicionar 1ml de etanol 70% gelado;
6. Centrifugar por 20 minutos a 13.200 rpm;
7. Descartar gentilmente o sobrenadante.

SECAGEM

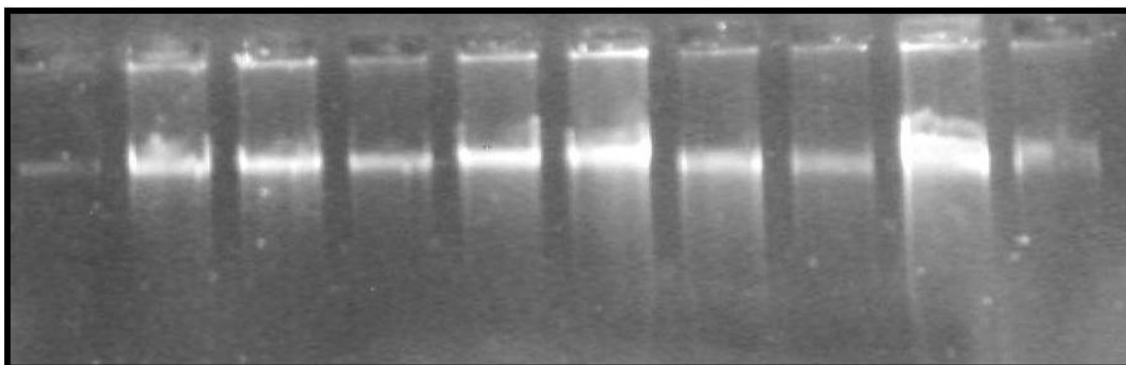
1. Deixar o precipitado de DNA secar com os tubos encostados em um papel a temperatura ambiente;
2. Colocar na estufa a 37°C por 20 minutos com uma folha de papel sobre as tampas abertas;
3. Adicionar 100µl de TE 1x;
4. Deixar em banho-maria a 37°C por 30 minutos;
5. Adicionar 2µl de RNase e encubar em banho-maria a 37°C por mais 2h;
6. Estocar em *freezer* a – 20°C.

5.3 QUALIDADE DA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

O sucesso da extração do DNA foi determinado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1x por 30 minutos a 100V e 50mA, com aplicação de 3µl de DNA total com 1µl de corante azul de bromofenol 1,5%. A detecção das

bandas de alto peso molecular foi evidenciada por coloração em brometo de etídio 0,5 µl/ml em água destilada, durante 15 minutos e visualizados em luz UV (figura 5).

Figura 5: Demonstração da qualificação da extração de DNA em Gel de Agarose 0,8%.



As amostras foram quantificadas para determinar a concentração (ng/µl) em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000) e todas elas diluídas para 20ng/µl.

5.4 ISOLAMENTO DE MICROSSATÉLITES

O trabalho de construção da biblioteca genômica para *A. montensis* foi conduzido no laboratório de Biodiversidade Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob os cuidados e orientações da Professora Dra. Marlise Ladvocat Bartholomei-Santos.

A amostra que apresentou melhor qualidade e pureza na extração de DNA foi selecionada para o procedimento de isolamento de microssatélites, de acordo com o protocolo de construção de Biblioteca Genômica enriquecida com Microssatélites de Refseth *et. al.* (1997), com modificações.

5.4.1 CLIVAGEM

Uma alíquota de aproximadamente 100ng/ μ l de DNA de *A. montensis* foi tratada com a enzima de restrição *TaqI* (Fermentas®), que reconhece o sítio 5'...TCGA...3' / 3'...AGCT...5' e cliva entre os nucleotídeos T/C formando extremidades coesivas - pequeno número de nucleotídeos em cadeia simples.

Seguindo as instruções do fabricante, para a clivagem foi utilizado uma mistura de reação com volume final de 40 μ l (Tabela 1).

Tabela 1: Reagentes e volume em microlitros (μ l) para a mistura da clivagem.

Reagentes	Volume (μ l)
DNA genômico (100ng/ μ l)	20
Tampão de Reação 10x	4
Enzima <i>TaqI</i>	1
Água Ultrapura	15
Volume Final	40

A mistura de clivagem da amostra foi encubada em banho-maria a 65°C, temperatura de atividade da enzima, por 4h. O sucesso da clivagem foi testado em gel de agarose 0,8% pela comparação dos fragmentos de restrição com a banda do DNA genômico originalmente extraído.

A amostra clivada foi precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto (100 μ l) e 1/10 (4 μ l) do volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2). A lavagem foi feita com etanol 70% gelado e por fim ressuspensa em 40 μ l de água ultrapura.

5.4.2 LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES

O adaptador *TaqI* (20/22 Mer: 5'-ATGAAGCCTTGCAACTGGAT-3') foi previamente anelado às extremidades coesivas dos fragmentos obtidos (Tabela 2), para posterior hibridização a oligonucleotídeos biotinilados contendo as sequências di [(GT)*n*] e tetranucleotídicas [(GATA)*n*].

Tabela 2: Reagentes e volume em microlitros (μ l) da mistura de reação para ligação dos adaptadores.

Reagentes	Volume (μ l)
DNA clivado	10,0
Tampão da Ligase 10x	2,0
T4 DNA ligase	1,0
Adaptador <i>TaqI</i> 20/22 Mer (50ul)	5,0
Água Ultrapura	2,0
Volume Final	20,0

Após a hibridação, a amostra foi tratada com solução de partículas paramagnéticas recobertas pela proteína estreptavidina (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Dynal), a qual apresenta alta afinidade por biotina. Esse passo promove a ligação da estreptavidina com a biotina, as quais estão unidas aos fragmentos contendo DNA microssatélite. Em seguida, por meio do emprego de um aparato com íma promoveu-se a separação e recuperação apenas dos fragmentos contendo microssatélites, através da atração das partículas paramagnéticas.

Após sucessivas lavagens de estringência com soluções de 2X SSC/0,1% SDS e 1X TE/NaCl 2M e 1M, os fragmentos de interesse foram liberados do complexo esfera magnética + sonda biotinilada por desnaturação e as fita-simples, contendo sequências repetitivas, foram utilizados como molde em uma Reação em Cadeia da Polimerase (Tabela 3) que utiliza a sequência do adaptador como iniciador.

Tabela 3: Condições da PCR para amplificação da simples fita de DNA capturado com sequências repetidas.

Reagentes	Volume em μl
DNA capturado	10,0
Tampão 10x	2,5
MgCl ₂ 25mM	4,0
dNTPs 10mM	1,0
Primer <i>TaqI</i> 20Mer 5 μ M	1,0
Taq 5U/ μ l	0,25
Água Mili-Q	6,25
Volume final	25,0

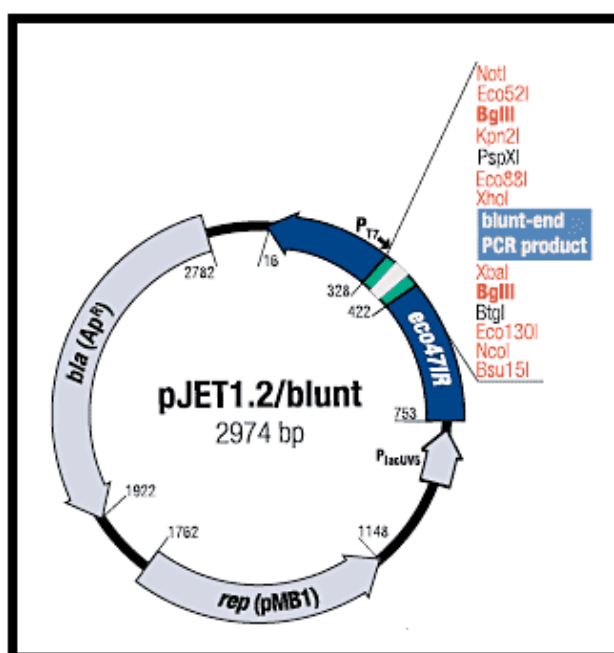
As condições de amplificação foram: 95°C por 5 min, 27 ciclos de 95°C por 1 min, 61°C for 30s, 72°C for 2 min e uma extensão final de 8 min a 72°C.

5.4.3 CLONAGEM

A clonagem dos segmentos de DNA amplificados foi realizada utilizando

o kit de clonagem CloneJET™ e os produto da PCR foram inseridos em um vetor plasmidial pJET1.2/blunt (Figura 6), que possui um sítio de origem de replicação; gene para codificação de resistência ao antibiótico Ampicilina e o gene letal ECO47IR.

Figura 6: Mapa do plasmídeo utilizado para clonagem, evidenciando as três principais regiões: gene de resistência a ampicilina (*bla_{Ap^R}*), Origem de replicação (*rep_{pMB1}*) e o gene *eco47IR*, onde será inserido o fragmento de interesse para clonagem (verde/branco/verde).



Os plasmídeos recombinantes obtidos foram sequenciados automaticamente utilizando-se o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE (Amershan Bioscience®).

As sequências dos locos de microssatélites obtidas foram primeiramente alinhadas através do programa MEGA 5.1 *beta* (TAMURA *et. al.*, 2011), analisadas no software ClustalW para verificar semelhança de clones e

posteriormente submetidas ao programa PRIMER3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000) para projeção dos iniciadores.

5.5 TRIAGEM DOS LOCOS MICROSSATÉLITES

Os iniciadores foram testados via PCR com DNA genômico de um espécime de *A. montensis*, para o estabelecimento das condições ideais de amplificação e temperatura de anelamento, partindo dos resultados obtidos no programa PRIMER 3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000). A PCR foi padronizada seguindo orientações do fornecedor da enzima *Taq* DNA polimerase, Magnésio e Tampão de reação.

Para avaliar o potencial dos locos obtidos como marcadores moleculares, foram testados os iniciadores em diferentes espécimes de *A. montensis* de uma mesma população localizada da Floresta Nacional de São Francisco de Paula (FLONA-SFP) no município de São Francisco de Paula, no estado do Rio Grande do Sul, com o intuito de detectar locos polimórficos e/ou monomórficos, sendo os últimos não informativo para futuro estudo de populações.

5.6 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES

Os sucessos de amplificação do produto da PCR foram avaliados em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante, em cuba vertical entre placas de 16x20cm e 20x20cm, onde a passagem da corrente elétrica move as partículas

de DNA através do gel mostrando um padrão de bandas após a revelação (HARTL, 2008).

O gel de poliacrilamida (acrilamida + bisacrilamida) é um polímero sintético que forma uma malha, com poros bem pequenos, que permite a visualização de diferenças moleculares pequenas. Quanto maior a concentração da acrilamida menores os poros e quanto maior a concentração de bisacrilamida, mais fechada é a malha do gel.

Após a polimerização do gel, 3 μ l do produto de PCR foram aplicados juntamente com 2 μ l de corante azul de bromofenol nos poços correspondentes, utilizando como controle um marcador de peso molecular de 25pb.

O gel foi revelado utilizando nitrato de prata, através de um processo realizado pelas seguintes etapas: colocar o gel em uma vasilha plástica e adicionar 250ml de solução fixadora por três minutos; descartar o líquido e lavar duas vezes com água destilada; colocar 250ml de nitrato de Prata 0,2% e levar ao microondas por 30 segundo na potência seis, descartar o líquido e lavar duas vezes com água destilada; adicionar em 250ml de solução fixadora, 250 μ l de formaldeído, dividir em duas porções e levar ao microondas por 30 segundos na potência seis, descartar o líquido e repetir a operação com a segunda porção da solução, aguardar o aparecimento das bandas, descartar o líquido e lavar duas vezes com água destilada; colocar 250ml de solução fixadora e levar ao microondas por 20 segundos na potência seis, mexer a vasilha para o gel ficar em movimento por cinco minutos.

O polimorfismo dos microssatélites foi identificado por meio de um método semiautomatizado, onde os segmentos amplificados, depois de desnaturados, foram submetidos a corrida eletroforética, juntamente com um

marcador de peso molecular, na plataforma MegaBACE 1000, gerando um eletroferograma no qual os alelos dos locos microssatélites foram separados por tamanho. Para esta técnica, os alelos foram avaliados no programa *Fragmente Profiler* version 1.2 (GE Healthcare®).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir do padrão dos picos obtido no eletroferograma, para cada loco de microssatélites, foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas em 24 indivíduos de uma mesma população proveniente das coletas realizadas no Rio Grande do Sul.

A variabilidade genética foi estimada através do número de locos polimórficos, número de alelos por loco, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) que foram analisados através do programa GDA - *Genetic Data Analyses* - versão 1.0 (LEWIS & ZAYKIN, 2001) desenvolvido para estudos de genética de populações.

Nei (1973) propôs que a diversidade genética refere-se ao nível de heterozigotos de uma população, ou seja, a heterozigosidade observada no seu estudo de populações, que é obtida por meio das frequências alélicas. A heterozigosidade observada (H_o) é uma medida da variabilidade genética das populações, reflete a quantidade de indivíduos heterozigotos para um determinado loco e é calculado pela seguinte fórmula:

$$H_o = \frac{\text{Número de heterozigotos em cada loco}}{\text{Número total de indivíduos analisados}}$$

A heterozigosidade esperada (H_e) é a quantidade de indivíduos heterozigotos esperados na população de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e é calculado pela seguinte fórmula:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

,onde p_i refere-se a frequência estimada do i ésimo alelo.

Esta abordagem pode ser aplicada para estudar a diversidade genética de qualquer população, independente do número de alelos detectados por loco, do nível de ploidia, do sistema de reprodução dos indivíduos e do padrão das forças evolutivas como seleção, mutação e migração.

Ainda utilizando o software GDA - *Genetic Data Analyses* - versão 1.0 (LEWIS & ZAYKIN, 2001) foram testados os valores do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, através do Qui-Quadrado pela aplicação da fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}}$$

A frequência de homozigotos, a diferença entre homozigoto esperados e observado e a presença de alelo nulo foi estimado para cada loco utilizando o programa MicroChecker – versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT; HUTCHINSON & WILLS, 2004). A frequência de alelo nulo foi obtida através de comparação

com os métodos de Chakraborty (CHAKRABORTY *et. al.*, 1992) e Brookfield (BROOKFIELD, 1996).

O coeficiente de endocruzamento ou endogamia (F_{is}) também é importante em estudo de populações e foi analisado pelo programa GDA, seguindo a padronização da estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1969) utilizando a seguinte fórmula:

$$F = 1 - \left[\frac{\text{Heterozigosidade Esperada} - \text{Heterozigosidade Observada}}{\text{Heterozigosidade Esperada}} \right]$$

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi analisado no programa GENES (CRUZ, 2006) fornecendo uma estimativa do poder discriminatório do iniciador, por considerar não somente o número de alelos por loco, mas também a freqüência relativa desses alelos. Seguindo a fórmula:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

onde, K = número de alelos; X_i = freqüência relativa do alelo i na amostra; X_j = freqüência relativa do alelo j na amostra.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma maneira geral as etapas descritas na metodologia ocorreram satisfatoriamente como segue abaixo:

6.1 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico de um exemplar de roedor da espécie *Akodon montensis*, proveniente do Laboratório de Citogenética e Evolução, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), coletado na localidade de São Francisco de Paula - RS apresentou resultado satisfatório, com um padrão de 199,5 ng/μl quando quantificado em espectrofotômetro NanoDrop2000® e banda bem evidente e sem rastros quando qualificado em gel de agarose 0,8%, conforme descrito na seção 5.1 e 5.2 de Materiais e Métodos. A utilização de CTAB cumpriu com o esperado e pode ser aplicado em pesquisas que envolvam a extração de DNA de roedores a partir de músculos armazenados em álcool.

6.2 BIBLIOTECA ENRIQUECIDA COM MICROSSATÉLITE

Ao longo do desenvolvimento do trabalho, pôde-se verificar que o método utilizado por Refseth e colaboradores (1997) para construção de Biblioteca Genômica Enriquecida com Microssatélites - que visa a hibridização de oligonucleotídeos biotinilados com fragmentos de DNA genômico ligado a adaptador e posterior captura das sequências contendo microssatélites

utilizando esferas magnéticas recobertas por estreptavidina, finalizada pela amplificação por PCR dos fragmentos capturados – funciona bem para a espécie *Akodon montensis*.

Esta metodologia já foi empregada em outros grupos de vertebrados com grande sucesso. Utilizando a mesma técnica e protocolo descrito por Refseth *et. al.* (1997) um grupo de pesquisadores da Universidade da Califórnia isolaram 11 locos polimórficos de microssatélites para *Anolis sagrei*, uma espécie de lagartos pertencentes ao gênero *Anolis*. As condições de PCR foram otimizados para cada conjunto de iniciadores e todos os locos foram avaliados para o polimorfismo e heterozigotidade em um total de 13 indivíduos capturados a partir de várias ilhas nas Bahamas. Cinco dos onze locos estavam significativamente fora do equilíbrio de Hardy-Weiberg (BARDELEBEN *et. al.*, 2004).

Assim como já isolados para peixes e répteis, foi observada a caracterização de microssatélites para aves, utilizando o mesmo protocolo descrito por Refseth *et. al.* (1997). Foram desenvolvidos 18 marcadores polimórficos para a águia-imperial-ibérica, *Aquila adalberti*, que teve 10 locos em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando testados em uma população de 38 águias (DALLY *et. al.*, 2004).

Com o objetivo de caracterizar locos microssatélites e avaliar a variabilidade existente dentro de populações naturais de peixes da espécie *Rhinichthys cataracta*, Girard & Angers (2006) seguiram o protocolo proposto por Refseth *et. al.* (1997) e obtiveram 11 iniciadores microssatélite. Ao testar estes iniciadores em 55 indivíduos de uma população local, oito dos onze

mostraram-se polimórficos, e entraram significativamente em equilíbrio de Hardy-Weinberg somente após a utilização da correção de Bonferroni.

Para mamíferos, estudos com marsupiais carnívoros do gênero *Dasyurus*, seis iniciadores foram isolados, seguindo o protocolo descrito por Rassmaan *et. al.* (1991), todos eles amplificaram em cinco espécies do gênero, apresentaram repetição (CA), foram polimórficos e com um número alto de alelos por locos (15 à 23) (FIRESTONE, 1999). Ortega *et. al.* (2002) isolaram para o morcego da Família Phyllostomidae, *Artibeus jamaicensis* 14 microsatélites, através da técnica descrita por Hamilton (1999), os locos foram testados em 125 indivíduos e mostraram-se polimórficos, encontrando-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população.

Dentro da Ordem Rodentia, foram isolados iniciadores para *Ctenomys torquatus*, utilizando a mesma técnica; no trabalho 10 locos microsatélites foram encontrados, todos em equilíbrio (RORATTO, BARTHOLOMEI-SANTOS & FREITAS, 2011). Com o objetivo de identificar as linhagens puras do hamster chinês, *Cricetulus griséus*, 16 sequências de microsatélite foram isoladas e genotipadas em 48 animais, apresentando resultado satisfatório de polimorfismo para todos eles (SONG *et. al.*, 2011). Para a tribo Akodontini, seguindo o protocolo de Glenn & Schable (2005), dez iniciadores microsatélites foram desenvolvidos para a espécie *Akodon azarae* e testados em 21 indivíduos provenientes de duas populações diferentes no centro da Argentina: Chucul e Piamonte. Oito destes iniciadores mostraram-se polimórficos, um apresentou desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg para ambas as populações e dois apresentaram desvio para apenas uma delas (VERA *et. al.*, 2011).

Em nosso trabalho utilizamos duas sondas, GT e GATA, para a espécie de roedor *Akodon montensis*. As repetições GT têm sido relatadas como as sequências de microssatélites mais frequentes em vários genomas animais (TAUZ, 1989; WEBER & MAY, 1989; STALLINGS *et. al.*, 1991; KATTI *et. al.*, 2001), o que também foi verificado em nosso estudo. A repetição GATA foi selecionada, apoiando-se nos resultados encontrados no trabalho de Roratto, Bartholomei-Santos & Freitas (2011), que mostrou estas sequências satélites com sucesso de amplificação e polimorfismo em uma espécie da ordem rodentia, *Ctenomys torquatus*.

6.3 CLONAGEM E ISOLAMENTO DOS MICROSSATÉLITES

A clivagem do DNA genômico total, em fragmentos menores, devido a ação da enzima *TaqI* ocorreu como o esperado e a ligação dos adaptadores 20/22 Mer nas extremidades coesivas destes fragmentos foi realizada com sucesso. Os adaptadores 20/22 Mer são importantes não só para a ligação das sondas biotiniladas, mas também pela ligação do DNA de *Akodon montensis* no vetor de clonagem.

A ligação das sondas biotiniladas (GT e GATA) nos adaptadores 20/22 Mer permitiu a separação dos fragmentos contendo microssatélites, devido à utilização de partículas paramagnéticas recobertas pela proteína estreptavidina e a sua alta afinidade com a biotina, permitindo apenas a atração destas sequências alvo no aparto magnético, conforme descrito na seção 5.3.2 de Materiais e Métodos.

A transformação bacteriana ocorreu de forma satisfatória, sendo observada na placa de controle negativo nenhuma colônia, na de controle positivo poucas colônias e nas de sonda GT e GATA muitas colônias (figura 7). A placa da sonda GATA apresentou mais colônias que a placa da sonda GT.

Figura 7: Placa da Sonda GATA mostrando as inúmeras colônias encontradas.



Para a extração de DNA dos plasmídios das bactérias recombinantes, foram semeadas novas culturas individuais de 40 colônias de GT e 58 de GATA. Uma placa réplica (figura 8) foi montada e todas as colônias semeadas foram identificadas, cultivadas novamente em meio LB líquido com ampicilina e armazenadas por período *overnight* sob agitação a 37°C.

Das colônias cultivadas de sonda GT, apenas duas não apresentaram crescimento, todas as outras tiveram resultado satisfatório. Estas passaram pela extração de plasmídeos e depois de verificadas em gel de agarose 0,8% (figura 9) em corrida de 30 minutos a 130V e 50mA foram armazenadas em freezer a -20°C.

Figura 8: Demonstração do plaqueamento réplica.

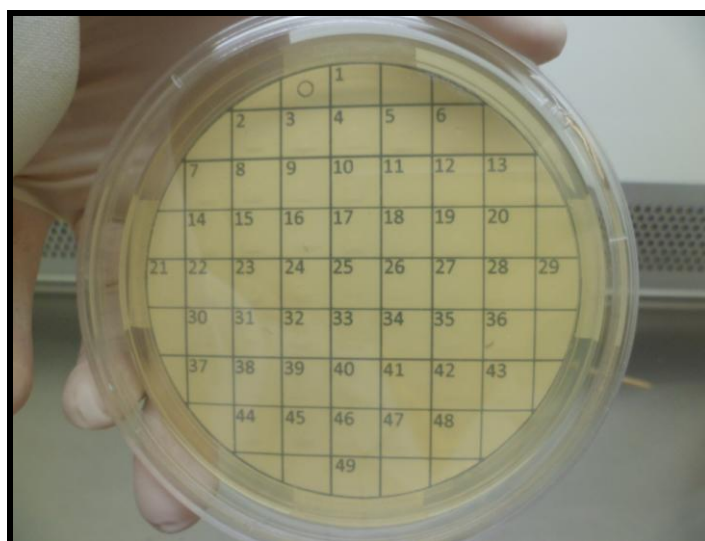
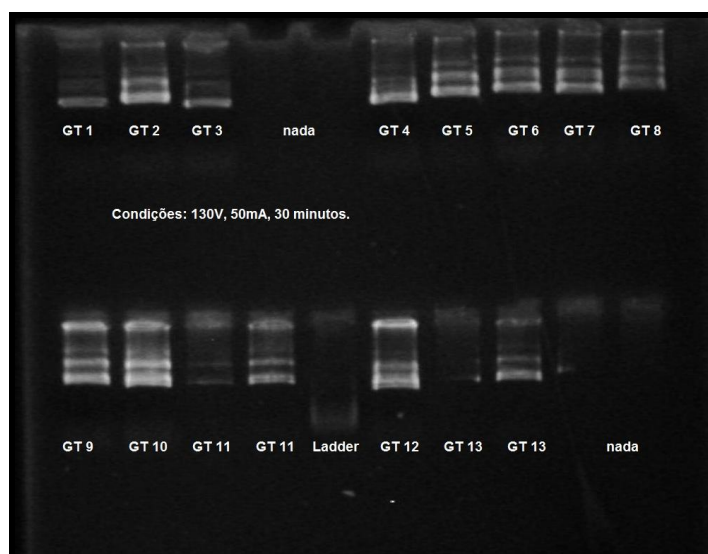


Figura 9: Verificação em gel de agarose 0,8% de alguns plasmídeos extraídos.

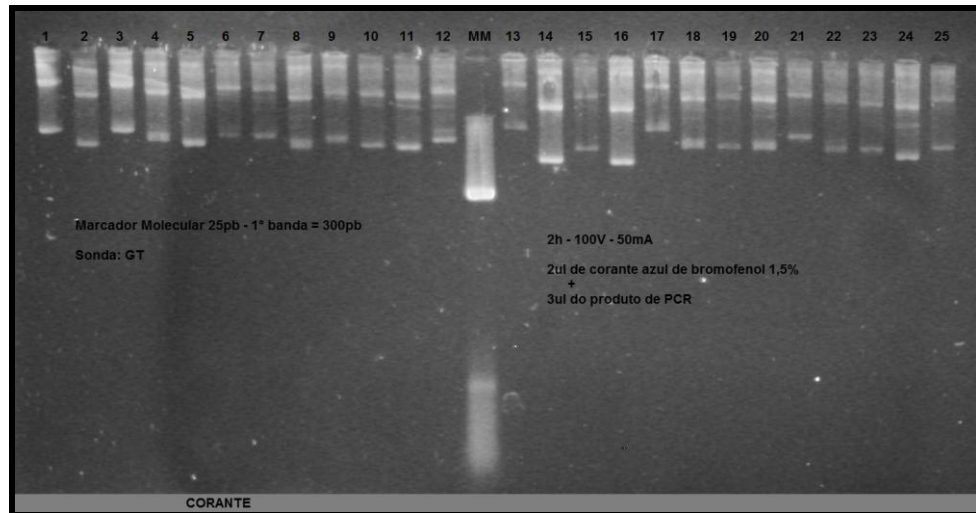


Legenda: GT= sonda; numeração= indivíduo (2vezes GT 11 e GT 13 por causa da quebra de poços); ladder= marcador de peso molecular (25pb) utilizado como controle.

Foram selecionados 50 plasmídeos, 25 com sonda GT e 25 com sonda GATA - utilizando como critério a intensidade e definição das bandas no gel – para realização da PCR e sequenciamento. O sucesso de amplificação da PCR foi verificado em gel de agarose 0,8% tanto para amostras com sonda GT (figura 10) quanto para com as amostras de sonda GATA (figura 11), em

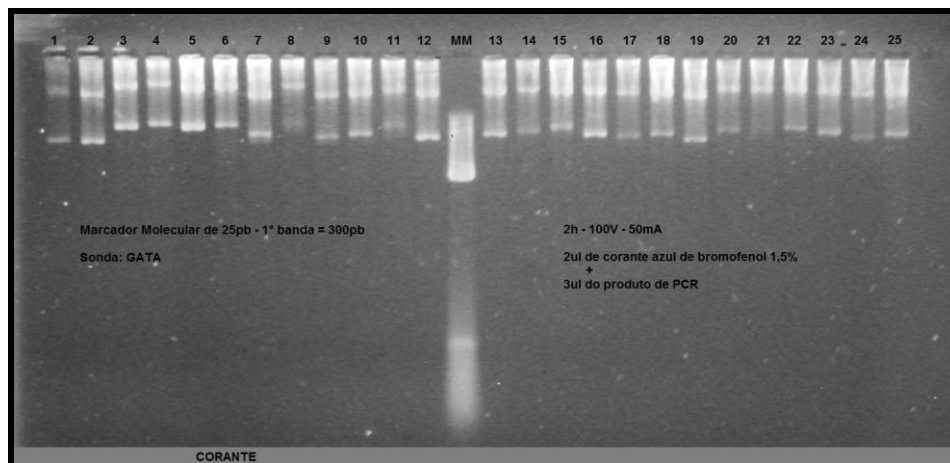
corrida de 2 horas a 100V e 50mA, com amplificação para todos os 50 plasmídeos extraídos.

Figura 10: Gel de agarose 0,8% para garantia do sucesso de amplificação via PCR dos plasmídeos extraídos com sonda GT.



Legenda: Numeração de 1 à 25 identificando os 25 plasmídeos extraídos para sonda GT. MM= marcador molecular (ladder).

Figura 11: Gel de agarose 0,8% para garantia do sucesso de amplificação via PCR dos plasmídeos extraídos com sonda GATA.



Legenda: Numeração de 1 à 25 identificando os 25 plasmídeos extraídos para sonda GATA. MM= marcador molecular (ladder).

Sugere-se que os outros dezessete plasmídeos sequenciados não tiveram resultados satisfatórios com a região de microssatélite por três motivos:

1. Não foi encontrada a extremidade que identifica o oligonucleotídeo adaptador, não conseguindo definir assim, onde termina a sequência do vetor e se inicia a sequência do organismo em questão;
2. O número de unidades repetitivas não é grande o suficiente (4 à 7 repetições), diminuindo as chances de deslize da DNA polimerase e origem de mutação, afinal polimorfismo dos locos aumenta quando há um maior número de unidades repetitivas (BECKMANN & WEBER, 1992);
3. Apresentaram microssatélites imperfeitos com mutações de troca de base (C → G, por exemplo) ao longo da sequência e essas bases que interrompem um microssatélite podem estabilizar o segmento repetitivo, reduzindo a probabilidade de alinhamento errôneo e resultando em níveis menores de polimorfismo quando comparados a microssatélites perfeitos (ESTOUP & CORNUET, 1999).

6.4 TRIAGEM DOS LOCOS MICROSSATÉLITES

A ligação dos adaptadores 22 Mer: 3' ATG AAG CCT TGG TAC TGG AT 5' e 20 Mer: 3' CGA TCC ACA ACC AAG GCT TCA T 5', possibilitou o reconhecimento e isolamento dos trechos genômicos clonados da espécie *Akodon montensis*. A identificação dessas sequências foi possível, pois os adaptadores são responsáveis por inserir no sítio de clonagem do vetor, a sequência de DNA da espécie estudada, formando uma sequência específica observada da seguinte forma: DNA Vetor → Adaptador 20Mer → DNA *Akodon montensis* → Adaptador 22Mer → DNA Vetor (Figura 13).

Figura 13: Exemplo de como detectar a sequência do genoma de *Akodon montensis* no arquivo de clonagem do plasmídeo.

```

1426 (Amostra 9 / Sonda GT / Forward)
CCCACGGAATCTTCGGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAGATATGAAGCCTT
GGTACTGGATATAAACAAATGTGTGCTGTATTAGATATAGTATCAAATAT
TTGGGTTGATATGTTAATTTGTAGTAGCTTTAAATCCAGGAAACTAGAA
TGGGATGATTGGTGGAGAGGAGCAAAAAATATTACAAATAGGGGAAGAGC
CAAATGCTGGTATTTAACGTGAAAAAGAGGAATAGTGTGAAAGGAGGTTT
GGGAAGATGGATGGAGAGATAAGACAGTGAAAGGGTGAGGGGAGAATAAC
AGCAGCAAAGATATTTGGGAAAACCAAAATCTCTCTCCCTTTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAT
TAAAAATGATTCAATTGTTCACTACTAGGCATTAATAATGCAGAGAGAA
AGGCAGATACATGGATACAATAAGTAACTCAATAAGTGCCTGTTCTTG
TTAGTCTCATAGGTAGATATACTTGAGTAATTGGGTTGAGTCCCTATACA
CCTTAGCCCAGTGTATGTCAAATAAATGTGCCTGGTTCCACCCTTAC
TCTTTTTCTTCCGAAGACCTTAAGTGGCTAACAGCAGAAACCATTTAG
GAATTGGTAAATGCAATTTGTATCGATCCAGTACCAAGGCTTCATGATCC
AGTACCAAGGCTTCATATCCAGTACCAAGGCTTCATATACTGATCGATCC
AGTACCAAGGCTTCATATCCAGTACCAAGGCTTCATAATCCAGTACCAAG
GCTTCATATCCAGTACCAAGGCTTCATATCCAGTACCAAGGCTTCATATC
CAGTACCAAGGCTTCATATACTGATCGATCCAGTACCAAGGCTTCATATC

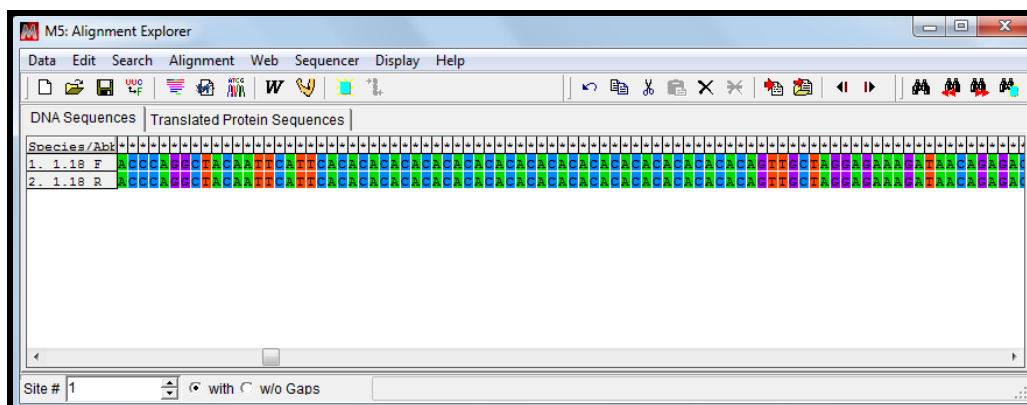
```

Legenda: Sequencia de um clone: em negrito o DNA do vetor, em amarelo a sequência dos adaptadores 20/22Mer, sublinhado parte do genoma de *A. montensis* e em vermelho um microssatélite.

A identificação da sequência dos adaptadores, flanqueando a sequência alvo, ou seja, a sequência genômica de *A. montensis*, permitiu encontrar o DNA de interesse para desenvolvimento deste trabalho.

Este isolamento deve ser feito tanto com a sequência *forward* quanto com a *reverse* de um mesmo clone, para que ao rodar esses dados no programa MEGA 5.10 seja possível observar o alinhamento correto de ambas as fitas (figura 14), evitando a utilização de clones com erros de sequencias. Com estas metodologias foram obtidos 30 clones com alinhamento correto, dos 33 que apresentavam sequência satélite.

Figura 14: Demonstração de um arquivo de alinhamento correto entre as duas fitas sequenciadas, gerado no programa Mega 5.1 beta.



Após os clones terem sido alinhados, foi verificada a semelhança entre eles para evitar o desenvolvimento de iniciadores idênticos. Esta verificação foi feita através do programa ClustalW (figura 15), e como resultado obtivemos apenas um par de clones com 100% de semelhança, sendo descartado um deles para análise.

Com clones alinhados e sequências semelhantes verificadas, o desenho dos iniciadores foi feito no programa Primer3 (figura 16). Dos 30 locos, 28 apresentaram suas extremidades longas o suficiente para a projeção de um iniciador. Quinze foram escolhidos para síntese, doze de repetição GT e três de repetição GATA, a escolha dos locos foi baseada no número de repetições e no tamanho dos alelos. A ocorrência de alelos com tamanhos diferentes facilitou a aplicação de *multiplex* – dois lócus distintos, com tamanhos de alelos relativamente distantes, aplicados juntos em uma mesma placa para redução do custo na análise populacional.

Figura 15: Análise de semelhança dos clones no programa ClustalW. 100% de semelhança (score) entre os clones 1.4 e 1.18 (indicado pela seta).

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	1.2	218	2	1.4	198	48.0
1	1.2	218	3	1.6	610	69.0
1	1.2	218	4	1.8	305	50.0
1	1.2	218	5	1.9	275	47.0
1	1.2	218	6	1.11	145	46.0
1	1.2	218	7	1.15	553	60.0
1	1.2	218	8	1.18	198	48.0
1	1.2	218	9	1.20	294	50.0
1	1.2	218	10	1.21	433	61.0
1	1.2	218	11	1.22	685	77.0
1	1.2	218	12	1.24	366	63.0
1	1.2	218	13	2.5	368	54.0
1	1.2	218	14	2.7	177	41.0
1	1.2	218	15	2.23	664	69.0
2	1.4	198	3	1.6	610	75.0
2	1.4	198	4	1.8	305	59.0
2	1.4	198	5	1.9	275	60.0
2	1.4	198	6	1.11	145	57.0
2	1.4	198	7	1.15	553	74.0
2	1.4	198	8	1.18	198	100.0
2	1.4	198	9	1.20	294	58.0
2	1.4	198	10	1.21	433	66.0

Figura 16: Resultado do desenho dos iniciadores, bem como tamanho esperado do fragmento e temperatura média de anelamento.

Primer3 Output						
No mispriming library specified						
Using 1-based sequence positions						
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3' seg</u>
LEFT PRIMER	228	20	60.09	40.00	4.00	3.00 TGACTTGTGGGAATGCAAA
RIGHT PRIMER	435	20	59.85	50.00	2.00	0.00 CTGCCTTTAGCCCTTCTTT
SEQUENCE SIZE: 971						
INCLUDED REGION SIZE: 971						
PRODUCT SIZE: 208, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00						
TARGETS (start, len)*: 369,30						

Legenda: tm = Temperatura média de anelamento por iniciador; gc% = quantidade de guanina e citosina presente; seg = sequência do iniciador; left primer = sequência forward; right primer = sequência do reverse; sequence size = tamanho total da sequência analisada; product size = tamanho da sequência de iniciador à iniciador, ou seja, o tamanho do alelo.

Os iniciadores foram nomeados com a sigla *Akom* (Ako = Akodon; m = montensis) e numerados de 01 a 15. A temperatura ideal para o anelamento foi calculada pelo programa PRIMER3, baseando-se: 1. no comprimento do iniciador, pois quanto maior a sequência, maior será a temperatura; 2. na quantidade de bases nitrogenadas Adenina – Timina e Citosina – Guanina encontradas na sequência, isso ocorre devido a necessidade de quebra das pontes de hidrogênio existente entre estas bases, sendo duas pontes entre A – T e três entre C – G (MONDEGO, 2008). Na tabela 4 encontram-se as descrições e denominações dos 15 iniciadores utilizados

Tabela 4: Informações dos quinze iniciadores selecionados para síntese

Nome	Sequencia do iniciador	T°C	Seq.	Alelo
<i>Akom 01</i>	F:GGAAGCAAACACAGACCCAGA R: CCCCTACACCCATTCTCTC	59,05 59,89	GT (21)	247
<i>Akom 02</i>	F: ACATTGCATGGACCCAACTC R: CCCCTACACCCATTCTCTC	59,97 59,93	GT (20)	173
<i>Akom 03</i>	F: CCATCAATCTGCCTTTCTCTCTG R: GGAGCATTGGGAAGATGGAT	60,27 60,13	GT (28)	222
<i>Akom 04</i>	F: CCTCCTCATTCTTTCCACACA R: AATCTTTTCCCAGGCAGACA	60,08 59,38	GT (18)	226
<i>Akom 05</i>	F: CCCTTCAATCATTCTACATCC R: TCCTACATGGACACAAAAGCAT	59,67 57,72	GT (34)	216
<i>Akom 06</i>	F: ACACCAGCATGGGCAGAT R: GCCGCAAGCTCAGCCTTTA	61,17 60,50	GT (18)	246
<i>Akom 07</i>	F: TCTCTAAACATTGAGGCTAACCAAA R: TTGGCAATTA AAAACACACTGA	59,85 57,52	CT (32) GT (16)	158
<i>Akom 08</i>	F: TGACTTCATGGGAATGCAAA R: CTGCCTTTAGCCCCTTCTTT	60,09 59,85	GT (15)	208

<i>Akom 09</i>	F: TCAAAATATGATACCCCTCCAAA R: CCCATTGCATCCACATATCA	59,58 60,16	GT (24)	250
<i>Akom 10</i>	F: ATAGATGAAGGCAGGCATGG R: TGCTCACCCCAATATATGCAC	60,06 59,66	GATA (13)	162
<i>Akom 11</i>	F: TGAAACCACATTTGCACACA R: CCATCATCTTTTCATCCCATC	58,57 59,23	GT (20)	190
<i>Akom 12</i>	F: GCATTTCACTCAGCCTCAGA R: CAGAAGCACTCACCCACTCA	59,99 59,87	GATA (11)	217
<i>Akom 13</i>	F: TCACACTTATTCTCTTCCCAAG R: CCACCCACTCTATCTATCCACCT	58,90 60,61	GATA (10)	296
<i>Akom 14</i>	F: GCCACAGAGAATTGGCATCA R: TTTTCATGACCTCCCCACAAT	60,12 60,17	GT (17)	203
<i>Akom 15</i>	F: TTCACCAACAGAGCAAAAAGC R: CAAAAAGGGCACATGACAGG	59,05 60,34	GATA (10)	274

Legenda: F = sequência forward, R = sequência reverse, T°C = temperatura de anelamento encontrada para cada sequência, Seq. = sequência satélite que forma o microssatélite.

Como estratégia de marcação de fluorescência dos iniciadores, utilizamos uma sequência específica na extremidade 5' para todos os iniciadores *forward*, a M13(-21) de 18 pares de bases - TCA AAA ACG GCC ACA – que servirá de molde para o Iniciador Universal ligar-se na segunda etapa da PCR. Para esta estratégia de marcação de iniciadores, além da síntese desta sequência específica no iniciador *forward*, e do iniciador *reverse*, é necessário um terceiro iniciador, conhecido como fluorescência Universal, este também possui a sequência M13(-21) de 18 pares de bases, porém apresentando fluorescência FAM ligada a sua extremidade 5', que marca todas as sequências-alvos já amplificadas na primeira etapa da PCR (SCHUELKE, 2000). Esta estratégia de marcação de iniciadores garante um menor custo da síntese dos mesmos, já que cada iniciador é acrescido de 18 pares de bases

não sendo necessário que estes sejam previamente marcados com fluorescência.

O iniciador universal mostrou-se uma ótima ferramenta para análise de microssatélite em método semiautomatizado, conseguindo cumprir com o objetivo proposto por Schuelke (2000). A utilização dessa técnica dificulta a aplicação de multiplex em iniciadores com tamanho de alelos relativamente próximos, mas reduz o custo na síntese das sequências *forward* e *reverse* com inserção de fluorescência direto do fornecedor. Além do mais, a aquisição de iniciadores universais, possibilita a realização de inúmeros trabalhos e análise de sequências sem a necessidade de novas compras com marcação específica, sendo apenas necessário o acréscimo dos 18 pares de bases, complementares, na extremidade 5' da fita *forward*.

6.5 ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES

Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (tabela 5), os testes de amplificação dos quinze iniciadores foram realizados com uma amostra de DNA padrão, extraído do indivíduo cujo DNA serviu de base para a construção das Bibliotecas enriquecidas com microssatélites GT e GATA.

Devido à inserção do iniciador universal na sequencia alvo logo após a amplificação da mesma, a PCR apresenta duas etapas importantes (Tabela 6). Na primeira etapa ocorre o anelamento do iniciador específico para amplificação da sequencia alvo e na segunda etapa ocorre o anelamento do iniciador universal na cauda específica já sintetizada junto com o iniciador *forward*.

Tabela 5: Condições da Reação em Cadeia da Polimerase.

Reagentes	[] Inicial	[] Final	Vf 20µl
Buffer	10x	1x	2,0µl
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8µl
dNTP	2mM	0,2mM	2,0µl
Primer R	10uM	0,04uM	0,2µl
Primer F	10uM	0,16uM	0,5µl
Primer U	10uM	0,16uM	0,5µl
Taq.	5U/ul	1U/reação	0,2µl
DNA	20ng/ul	60ng	3,0µl
H ₂ O	—	—	10,6µl

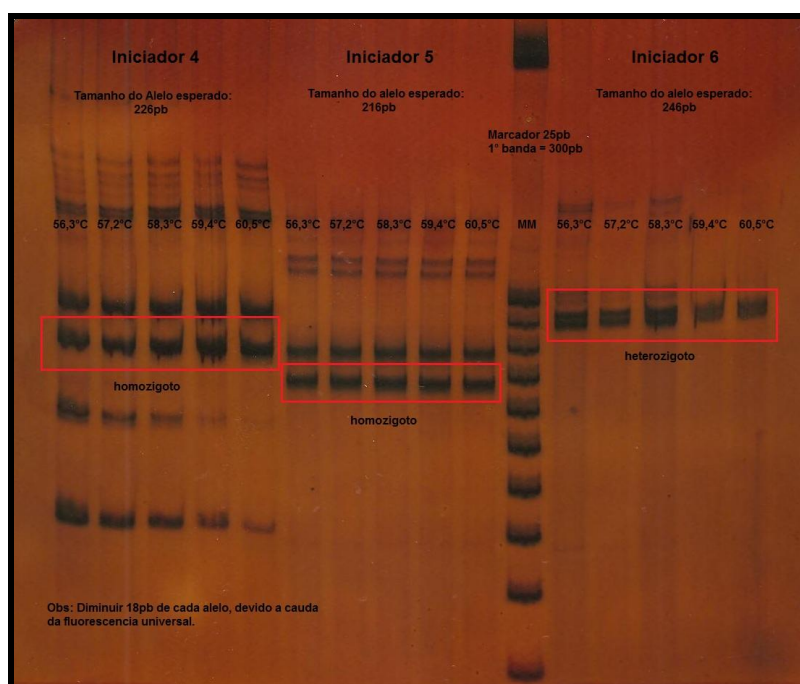
Tabela 6: Ciclos da PCR. 1º etapa de anelamento do iniciador específico e a 2º etapa de anelamento da fluorescência universal.

1º ETAPA	Desnaturação Inicial: 95°C por 5 minutos. Desnaturação: 95°C por 40 segundos. Anelamento: 60°C por 1 minuto. Extensão: 72°C por 40 segundos.	Anelamento do iniciador específico 29 ciclos
2º ETAPA	Desnaturação Inicial: 94°C por 5 minutos. Desnaturação: 94°C por 40 segundos. Anelamento: 53°C por 40 segundos. Extensão: 72°C por 40 segundos. Extensão final: 72°C por 5 minutos.	Anelamento do iniciador Universal 8 ciclos

A fluorescência foi adicionada no tubo de PCR entre a primeira e a segunda etapa, evitando assim perda da especificidade e de quantidade através de anelamento não específico durante a primeira etapa.

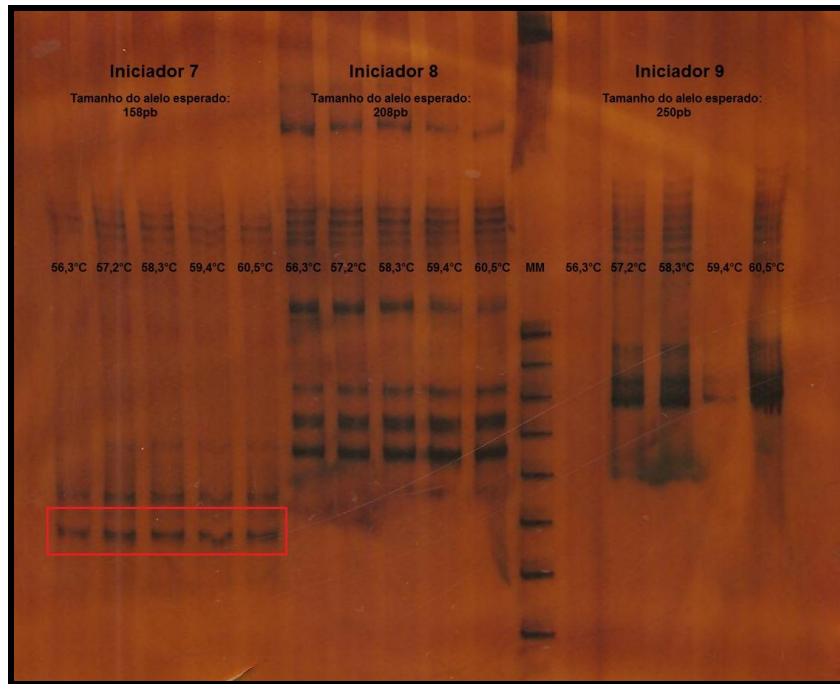
Os produtos de PCR foram verificados em gel de Poliacrilamida não desnaturante 8% a 200V e 50mA por 4h. Exceto Akom 01, Akom 02, Akom 03 e Akom 15 que não tiveram sucesso de amplificação, todos os demais iniciadores, Akom 4, Akom 5, Akom 6 (figura 17), Akom 7, Akom 8, Akom 9 (figura 18), Akom 10, Akom 11, Akom 12 (figura 19), Akom 13 e Akom 14 (figura 20) apresentaram amplificação satisfatória.

Figura 17: Sucesso de amplificação para os iniciadores 4, 5 e 6.



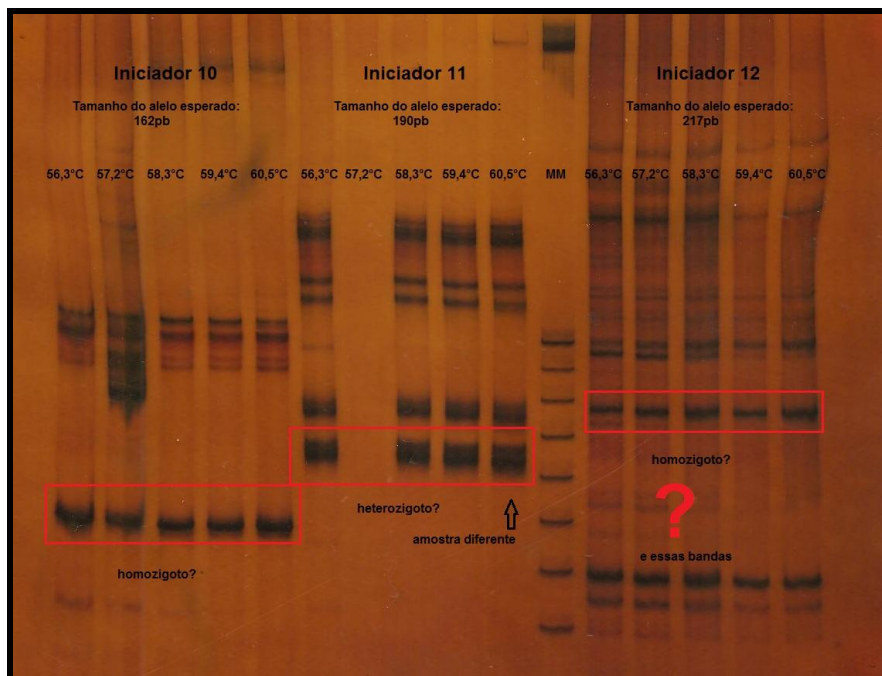
Legenda: Temperaturas = as cinco que foram utilizadas para o teste; MM = marcador molecular (ladder) de 25 pares de base, sendo que a primeira banda tem 300 pares de base de tamanho; Tamanhos dos alelos esperados pelo programa PRIMER 3.

Figura 18: Sucesso de amplificação para os iniciadores 7, 8 e 9.



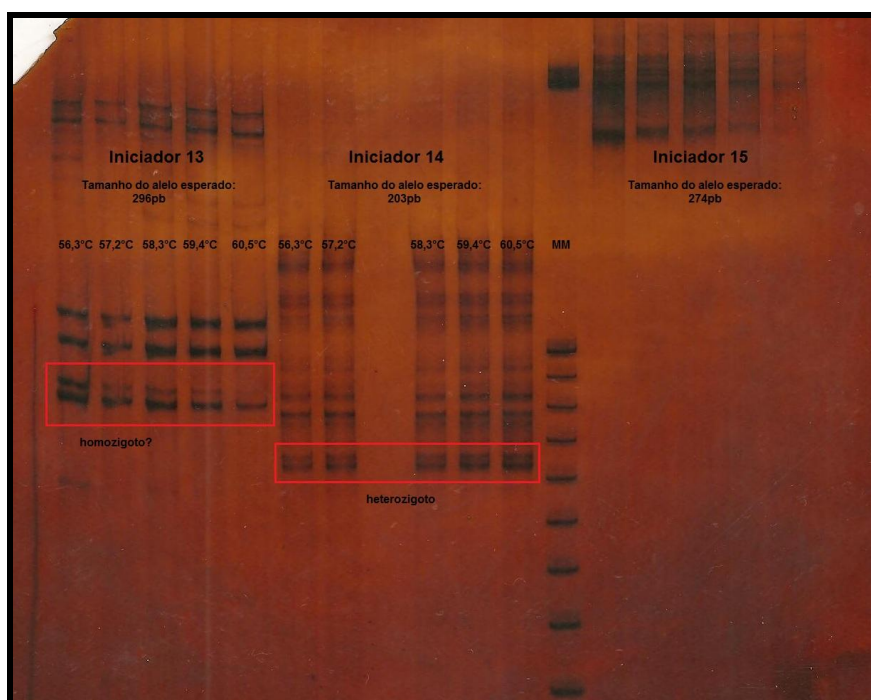
Legenda: Temperaturas = as cinco que foram utilizadas para o teste; MM = marcador molecular (ladder) de 25 pares de base, sendo que a primeira banda tem 300 pares de base de tamanho; Tamanhos dos alelos esperados pelo programa PRIMER 3.

Figura 19: Sucesso de amplificação para os iniciadores 10, 11 e 12.



Legenda: Temperaturas = as cinco que foram utilizadas para o teste; MM = marcador molecular (ladder) de 25 pares de base, sendo que a primeira banda tem 300 pares de base de tamanho; Tamanhos dos alelos esperados pelo programa PRIMER 3.

Figura 20: Sucesso de amplificação para os iniciadores Akom 13 e Akom 14.



Legenda: Temperaturas = as cinco que foram utilizadas para o teste; MM = marcador molecular (ladder) de 25 pares de base, sendo que a primeira banda tem 300 pares de base de tamanho; Tamanhos dos alelos esperados pelo programa PRIMER 3.

Testes com diferentes temperaturas (56°C à 60°C) foram realizados baseados nas informações obtidas no programa PRIMER 3, os quais não apresentaram diferença significativa, portanto a temperatura de anelamento foi padronizada em 60°C para todos os iniciadores.

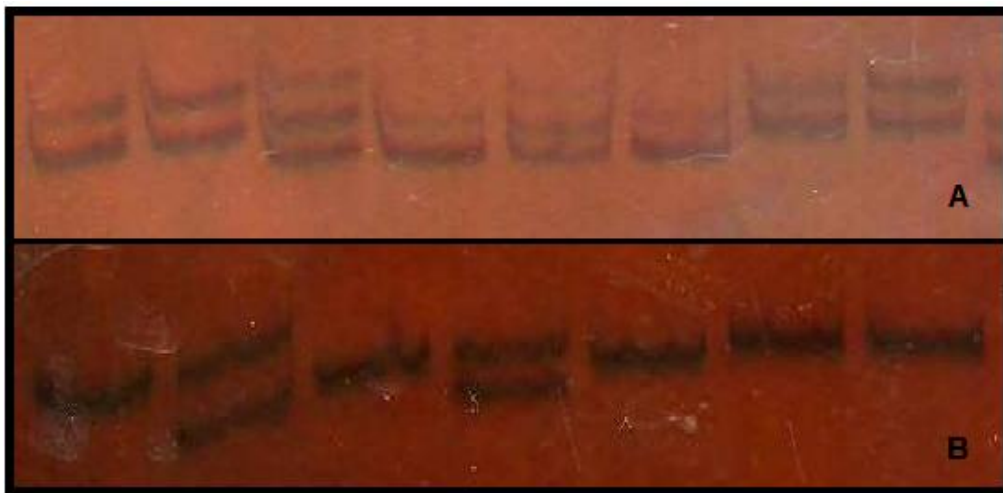
Os quatro iniciadores – 1, 2, 3 e 15 – que não tiveram sucesso de amplificação foram, em um primeiro momento, descartados, devido ao tempo reduzido para padronização destes iniciadores e à falta de material para repetição das análises e realização de novos testes. Porém, o trabalho continua, para acrescentá-los na publicação científica.

6.6 TESTANDO OS INICIADORES NA POPULAÇÃO DO FLONA – SFP.

Após a padronização das condições de PCR na amostra padrão, os 24 exemplares de *Akodon montesnis* coletados na FLONA – SFP e selecionados para o estudo desta população, foram amplificados para os nove iniciadores através da PCR.

Para certificar-se do sucesso da amplificação, estas amostras foram verificadas em mini gel de poliacrilamida 8% não desnaturante (figura 21), entre placas 12x9cm e 12x12cm por 1h a 100V e 50mA. As 24 amostras para os 12 iniciadores apresentaram bandas em alturas diferenciadas, sugerindo assim sucesso de amplificação e polialelismo.

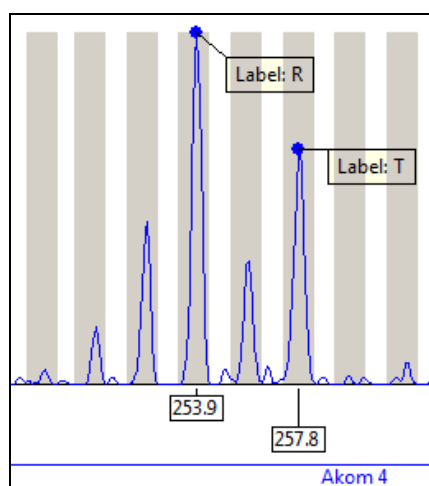
Figura 21: Exemplos da visualização do sucesso de amplificação em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante de alguns espécimes de dois iniciadores, Akom 4 (A) e Akom 8 (B).



Após a certificação da amplificação, as amostras foram carregadas no equipamento MegaBace1000®, em placas de 96 poços. No processo de montagem das placas cada poço recebeu 7,75µl de tween 20 0,1%; 0,25µl de

marcador ET-ROX 400 e 2µl do produto de PCR. O tempo para injeção das amostras nos capilares foi de 80 segundos a 3Kv e o tempo de corrida de 75 minutos a 10Kv. O eletroferograma gerado com a corrida foram analisados no programa *Fragment Profiler* (figura 22) e mostram picos que correspondem aos alelos de cada indivíduo da população.

Figura 22: Picos gerados pelo programa *Fragment Profiler* para o iniciador Akom 4 e a interpretação destes picos demonstrando o tamanho dos fragmentos encontrados, nesse caso um heterozigoto, 254 e 258 pares de bases, com valores já ajustados.

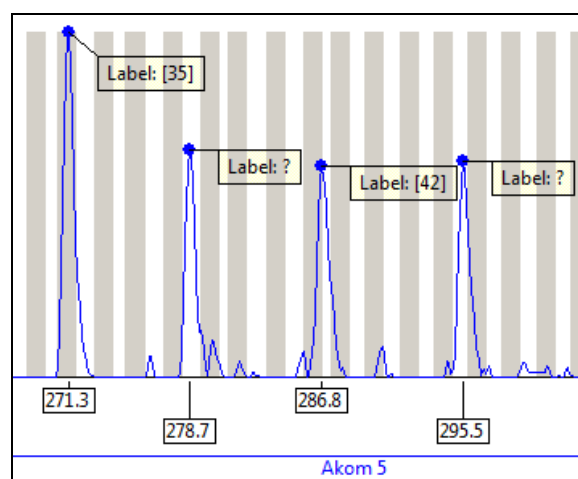


Os iniciadores Akom 5 e Akom 6 foram descartados da análise devido ao excesso de picos encontrados para uma mesma amostra nestes locos (figura 23). Os picos extras existentes na genotipagem destes iniciadores podem ser explicados pelas bandas *stutter*, produzidas por deslizamentos da DNA polimerase durante a reação de PCR, de modo a originarem fragmentos que são uma ou várias repetições mais curtas ou mais longas que o verdadeiro alelo. Após migração eletroforética, estas bandas apresentam-se como uma

cadeia de picos seguidos, sobressaindo um que será o verdadeiro alelo (MATSUMOTO *et. al.*, 2004).

Os erros de genotipagem são comumente observados e ocorrem quando o genótipo determinado após a análise molecular não corresponde ao genótipo real do indivíduo considerado. Estes erros podem ocorrer em qualquer dos passos da genotipagem (BONIN *et. al.*, 2004; POMPANON *et. al.*, 2005).

Figura 23: Iniciador Akom 5 e seu excesso de picos, impossibilitando a interpretação dos dados e análise das sequências.



Os picos dos nove iniciadores restantes, que apresentaram boas condições de análise, foram avaliados e mostraram-se polimórficos (tabela 7). Em ordem crescente para o número de alelos por locos temos: Akom 4, Akom 8 e Akom 14 com dez alelos; Akom 7, Akom 10, Akom 11 e Akom 13 com sete alelos; Akom 12 com seis alelos e Akom 9 com quatro alelos (gráfico 1). Sendo que a média encontrada foi de 7,5 alelos por locos.

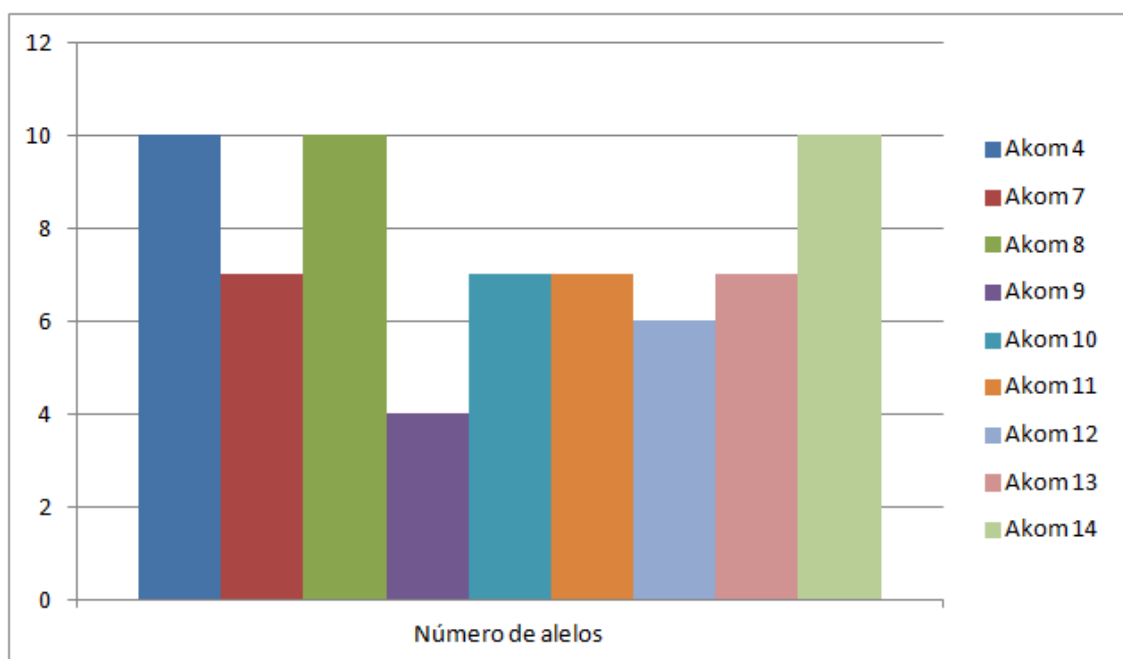
Tabela 7: Tamanho e frequência dos alelos encontrados para cada iniciador.

Akom 4	- 18 pb	Freq.	Akom 7	- 18 pb	Freq.	Akom 8	- 18 pb	Freq.
242	224	1	172	154	1	204	188	1
246	228	3	174	156	1	208	190	1
248	230	5	176	158	8	212	194	3
250	232	2	178	160	10	214	196	14
252	234	8	180	162	17	216	198	1
254	236	6	182	164	3	228	210	9
256	238	8	184	166	8	230	212	4
258	240	5	TOTAL	(158)	48	232	214	4
260	242	5				234	216	5
262	244	5				236	218	6
TOTAL	(226)	48				TOTAL	(208)	48
Akom 9	- 18 pb	Freq.	Akom 10	- 18 pb	Freq.	Akom 11	- 18 pb	Freq.
258	240	23	166	148	4	203	185	4
260	242	14	170	152	2	205	187	14
262	244	8	174	156	12	207	189	8
264	246	3	178	160	17	209	191	5
TOTAL	(250)	48	182	164	8	211	193	8
			186	168	4	213	195	6
			190	172	1	217	199	3
			TOTAL	(162)	48	TOTAL	(190)	48
Akom 12	- 18 pb	Freq.	Akom 13	- 18 pb	Freq.	Akom 14	- 18 pb	Freq.
226	208	9	298	280	12	200	182	1
230	212	7	302	282	1	208	192	1
234	216	7	314	296	4	210	194	3

238	220	11	318	300	6	214	196	2
242	224	13	322	304	9	216	198	10
246	232	1	326	308	14	218	200	7
TOTAL	(217)	48	330	312	2	224	206	1
			TOTAL	(296)	48	226	208	8
						228	210	10
						230	212	5
						TOTAL	(203)	48

Legenda: Akom n°= iniciador trabalhado e valores dos alelos encontrados. -18pb = tamanho do alelo (-) os 18 pares de bases da sequência universal. Freq. = frequência dos alelos por locos. Total = (____) tamanho do alelo esperado; 48 total do número de alelos.

Gráfico 1: Representação do polimorfismo encontrado por locus na população estudada.



Como descrito na sessão 5.6 de Materiais e Métodos, os valores para heterozigosidades observadas (H_o) e heterozigosidade esperadas (H_e) (figura 24), assim como o equilíbrio de Hardy-Weinberg (figura 25) foram calculados para todos os locos separadamente no programa GDA (LEWIS & ZAYKIN,

2001). A média de todos os locos para a He foi de 0,8125 e para Ho foi de 0,6065.

Figura 24: Valores de heterozigidade observada e esperada geradas no programa GDA, antes da detecção de alelos nulos.

Descriptive statistics (by locus):				
Locus	n	P	A	Ap
Ákom4	24.000000	1.000000	10.000000	10.000000
Ákom7	24.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Ákom8	24.000000	1.000000	10.000000	10.000000
Ákom9	24.000000	1.000000	4.000000	4.000000
Ákom10	24.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Ákom11	24.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Ákom12	24.000000	1.000000	6.000000	6.000000
Ákom13	24.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Ákom14	24.000000	1.000000	10.000000	10.000000
All	24.000000	1.000000	7.555556	7.555556
Locus	He	Ho		
Ákom4	0.898050	0.750000		
Ákom7	0.787234	0.458333		
Ákom8	0.851950	0.666667		
Ákom9	0.667553	0.791667		
Ákom10	0.784574	0.625000		
Ákom11	0.839539	0.541667		
Ákom12	0.812943	0.250000		
Ákom13	0.809397	0.750000		
Ákom14	0.861702	0.625000		
All	0.812549	0.606481		

Legenda: n = número de indivíduo analisado por locus; P = polimorfismo; A e Ap = número de alelos por locus; He = heterozigidade esperada; Ho = heterozigidade observada.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg teve sua interpretação partindo da hipótese nula (H0), que é apresentada sobre determinados fatores estatísticos, cuja negação é provada através de um teste de hipóteses adequado, neste caso, o Qui-Quadrado. A hipótese nula, geralmente afirma que não existe relação entre dois fenômenos medidos, ou seja, nossa H0 afirma não haver diferença entre a heterozigidade observada e a esperada. Como resultado pode-se aceitar ou rejeitar H0; para aceitar, é necessário um valor de p igual ou superior ao valor de α (0,05).

Figura 25: Valores do equilíbrio de Hardy Weinberg gerados no programa GDA, antes da detecção de alelos nulos.

```
Exact tests for linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium:
Subsets of loci will be analyzed
Subsets will be comprised of up to 2 loci
Individuals with missing data will be discarded
Number of runs: 3200
Measure: Fisher
Permute methods string: bbbbbbbbb
```

Population # 1 (RGS) of 24 individuals		
Runs	Prob	Locus combination
3200	0.176563	Akom4
3200	0.000625	Akom7
3200	0.009062	Akom8
3200	0.442500	Akom9
3200	0.096562	Akom10
3200	0.012500	Akom11
3200	0.000000	Akom12
3200	0.318437	Akom13
3200	0.023750	Akom14

Legenda: Runs = número de vezes que os dados foram rodados antes de gerar o resultado; Prob = valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em relação aos locos isolados, Akom 4, Akom 9, Akom 10 e Akom 13 tiveram seus valores de p superior a α e a hipótese nula foi aceita, indicando que para estes locos não há diferença entre a heterozigosidade observada e a esperada. Para a população estudada nesse trabalho, estes quatro locos se encontram significativamente em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Desvios significativos do equilíbrio, devido a deficiência de heterozigotos, foram observados para Akom 7, Akom 8, Akom 11, Akom 12 e Akom 14, que apresentaram erros de genotipagem pela presença de alelos nulos.

A frequência de homozigotos e a frequência da diferença entre homozigotos esperados e observados (Tabela 8), foram calculadas pelo programa MicroCheker através de simulações de Monte Carlo (*bootstrap*) usando um intervalo de confiança de 95% para cada loco individualmente. A frequência de alelos nulos é calculada por indivíduo/por locos, sendo significativo para valores superiores a 0,05. Em seguida, uma comparação de

dados utilizando três algoritmos (Chakiraborty, Brokfield 1 e Brokfield 2) estima a frequência real do alelo nulo, que mostrou-se significativa nos locos Akom 7, Akom 8, Akom 11, Akom 12 e Akom 14 (Figura 26), retratando a ausência de amplificação de um dos alelos destes iniciadores durante a PCR.

Tabela 8: Número gerado pelo programa MicroChecker, para os homozigotos observado e esperado em cada locus.

Lócus	Homozigoto esperado	Homozigoto observado
Akom 4	2,895	6
Akom 7	5,5	13
Akom 8	3,979	8
Akom 9	8,312	5
Akom 10	5,565	9
Akom 11	4,27	11
Akom 12	4,895	18
Akom 13	4,979	6
Akom 14	3,75	9

Figura 26: Dados gerados no programa MicroChecker para avaliar presença e ausência de alelos nulos em cada locus.

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Loco 4	no	0,0732	0,0794	0,0688	0,0688
Loco 7	yes	0,1947	0,2542	0,1765	0,1765
Loco 8	yes	0,1037	0,1116	0,0913	0,0913
Loco 9	no	-0,1327	-0,0955	-0,0835	0
Loco 10	no	0,0926	0,1028	0,081	0,081
Loco 11	yes	0,1669	0,2056	0,1539	0,1539
Loco 12	yes	0,3308	0,522	0,304	0,304
Loco 13	no	0,0428	0,0458	0,0395	0,0395
Loco 14	yes	0,1269	0,1489	0,1186	0,1186

Legenda: Locus = iniciadores; Null Present = presença de alelos nulos; No = não; Yes = Sim; Oosterhout = valores encontrados pelo programa; Chakraborty = primeiros dados usados para comparação; Brookfield 1 e 2 = segundo e terceiro dados usados para comparação.

Os locos que apresentaram alelos nulos tiveram o número de genótipos homocigotos ajustados para refletir as estimativas reais do número de homocigotos na população, sendo introduzido um valor zero para substituir um dos valores de alelos homocigotos, tornando-os heterocigotos (VAN OOSTERHOUT; HUTCHINSON; WILLS, 2006). A nova matriz de dados foi analisada novamente no programa GDA, com o objetivo de obter novos valores de Heterocigosidade observada/esperada (figura 27) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (figura 28). Após o ajuste, a média de todos os locos para a He foi de 0,8238 e para Ho foi de 0,7087.

Figura 27: Valores de heterocigosidade observada e esperada geradas no programa GDA, após a detecção de alelos nulos.

Descriptive statistics (by locus):				
Locus	n	P	A	Ap
Akom4	24.000000	1.000000	10.000000	10.000000
Akom7	15.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Akom8	23.000000	1.000000	10.000000	10.000000
Akom9	24.000000	1.000000	4.000000	4.000000
Akom10	24.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Akom11	19.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Akom12	9.000000	1.000000	6.000000	6.000000
Akom13	24.000000	1.000000	7.000000	7.000000
Akom14	22.000000	1.000000	10.000000	10.000000
All	20.444444	1.000000	7.555556	7.555556
Locus	He	Ho		
Akom4	0.898050	0.750000		
Akom7	0.804598	0.733333		
Akom8	0.862802	0.695652		
Akom9	0.667553	0.791667		
Akom10	0.784574	0.625000		
Akom11	0.857752	0.684211		
Akom12	0.856209	0.666667		
Akom13	0.809397	0.750000		
Akom14	0.873150	0.681818		
All	0.823787	0.708705		

Legenda: n = número de indivíduo analisado por locus; P = polimorfismo; A e Ap = número de alelos por locus; He = heterocigosidade esperada; Ho = heterocigosidade observada.

Em relação aos locos isolados, Akom 4, Akom 9, Akom 10 e Akom 13 não apresentaram alelos nulos e encontravam-se em equilíbrio desde a primeira análise, sendo que após a detecção de alelos nulos e novos valores

de p, Akom 7, Akom 11 e Akom 12 tiveram a hipótese nula foi aceita. Para a população estudada nesse trabalho, estes sete locos se encontram significativamente em Equilíbrio de Hardy-Weiberg e apenas os locos Akom 8 e Akom 14 encontram-se significativamente fora do equilíbrio.

Figura 28: Valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg gerados no programa GDA, após a detecção de alelos nulos.

```
Exact tests for linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium:
Subsets of loci will be analyzed
Subsets will be comprised of up to 2 loci
Individuals with missing data will be discarded
Number of runs: 3200
Measure: Fisher
Permute methods string: bbbbbbbbb
```

Population # 1 (RGS) of 24 individuals		
Runs	Prob	Locus combination
3200	0.173125	Akom4
3200	0.114062	Akom7
3200	0.020938	Akom8
3200	0.445312	Akom9
3200	0.081250	Akom10
3200	0.111875	Akom11
3200	0.057188	Akom12
3200	0.316563	Akom13
3200	0.047500	Akom14

Legenda: Runs = número de vezes que os dados foram rodados antes de gerar o resultado; Prob = valores do equilíbrio de Hardy-Weiberg.

No estudo de populações, os alelos nulos podem complicar a interpretação dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e confundir a análise da estrutura da população. Estes alelos têm sido encontrados em mais de 25% dos locos de microssatélites, chegando a atingir frequências superiores a 15% (JARNE & LAGODA 1996). São responsáveis pela não amplificação de uma ou ambas as sequências do DNA, devido a mutações que ocorrem na região de anelamento dos iniciadores. A não amplificação leva a detecção errônea, onde um genótipo heterozigoto pode resultar em um aparente homozigoto (ALDRICH *et. al.* 1998, WHITE *et. al.* 1999). A origem molecular dos alelos nulos vem do polimorfismo na região de anelamento do iniciador,

que surge devido a mutações pontuais, inserção ou deleção de bases (CALLEN *et. al.*, 1993).

A presença de alelos nulos em detrimento da alta variação em regiões flaqueadoras dos microssatélites tem sido demonstrada em inúmeros estudos moleculares. Estes sugerem que as sequências que flanqueiam o microssatélite podem ser menos estáveis que outras regiões genômicas (ANGERS & BERNATCHEZ, 1997; GRIMALDI & CROUAU-ROY, 1997; MEGLECZ *et. al.*, 2004). A presença de alelos nulos somente pode ser detectada pelo excesso de homozigotos e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os falsos homozigotos resultantes de alelos nulos interferem nas análises de genética de populações, afetando aparentemente as medidas de diferenciação e variação genética (CHAPUIS & ESTOUP 2007; PEMBERTON *et. al.*, 1995; REECE *et. al.*, 2004). Noventa por cento dos artigos que relatam alelos nulos em microssatélites tentam corrigir esse erro com ajustamento estatísticos do alelo visível e frequência do genótipo (ROQUES *et. al.*, 1999). É muito comum usar simulações computacionais baseados em coalescência para investigar a prevalência e distribuição dos alelos nulos em locos microssatélite (HUDSON, 1990).

As amostras de *Akodon montensis*, foram gentilmente cedidas por pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, responsáveis pelo planejamento e realização das coletas. Mesmo sem apresentar nenhuma barreira física, os pesquisadores dividiram a área em oito subáreas denominadas “grade”. A priori, estas oito grades foram criada com o objetivo de caracterizar oito populações diferentes, pois trabalhos suportam a hipótese que

roedores do gênero *Akodon*, não percorrerem distâncias longas quando em atividade.

Analisando taxa de captura e recaptura na região de Caucaia do Alto no estado de São Paulo, de Julho de 2003 a Março de 2005, Püttker *et. al.* (2006) avaliaram a distância média percorrida na área de estudo, em 5 espécies de roedor e duas e marsupiais. Entre os roedores, a espécie *Akodon montensis*, foi a que apresentou o maior número de indivíduos coletados e a menor distância percorrida entre todos os animais analisados, com uma distância média de 19,54 metros percorridos entre sucessivas capturas e média de 26,30 metros de distância máxima percorrida. Exemplares da espécie *Akodon montensis*, coletados em uma Floresta secundária do Rio de Janeiro, percorreram em média 40 metros (DAVIS, 1945) e *Akodon cursor*, uma espécie proximamente relacionada com *A. montensis*, teve 50% de todos os exemplares coletados na mata costeira do estado do Rio de Janeiro, se movimentaram menos que 30 metros (GENTILE & CERQUEIRA, 1995).

Os dados gerados no presente trabalho sugerem, a princípio, que não há uma divisão entre subpopulações e a área forma como um todo uma única população de *Akodon montensis*, utilizando como critério de sugestão o número significativamente alto de alelos por locos encontrado, além da presença de alelos raros encontrados em uma baixa frequência na maioria dos locos. Para confirmar essa questão, maiores estudos seriam necessários, com um número amostral maior e com representantes de todas as grades, assim, além de podermos afirmar a estrutura da população, aumentariam as nossas chances de genotipar mais heterozigotos – necessário para justificar a heterozigosidade esperada.

Falconer (1964) e Hartl & Clark (1989) definem endogamia como o acasalamento entre indivíduos que são relacionados por descendência, tendo como primeiro efeito uma mudança nas frequências esperadas de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg devido a um aumento na frequência de genótipos homozigóticos à custa da diminuição de frequência de genótipos heterozigóticos. Wright (1922) foi o primeiro autor a propor um coeficiente realmente capaz de descrever o grau de endogamia de um indivíduo a partir de sua genealogia. O coeficiente de endogamia de Wright expressa a correlação entre os valores gaméticos que formam a progênie derivada de uma população. Anos depois, o coeficiente de Wright foi generalizado por outros autores (HALDANE & MOSHINSKY, 1939; COTTERMAN, 1941; MALÉCOT, 1969). Conhecido por coeficiente F foi definido como a probabilidade de que dois alelos de um mesmo gene, presentes em um mesmo indivíduo, sejam idênticos por descendência.

O coeficiente de endogamia calculado no programa GDA, gerou um valor de 0,1435 (figura 29). A endogamia é um parâmetro que afeta diretamente a diversidade genética de uma população, tendo sido seu conceito introduzido por Wright (1951), é importante em estudos de populações e tem seus valores interpretados como: quando $F = 0$, temos uma população totalmente panmítica, resultado do cruzamento totalmente aleatório dos membros que a compõe, não apresentando consanguinidade; quando $F = 1$, temos uma população totalmente endogâmica, resultado do cruzamento entre indivíduos aparentados, com alta taxa de consanguinidade, unindo alelos idênticos por descendência (HARTL, 2008).

Figura 29: Valores encontrados para a estatística F de Whight (*F_{is}*).

Analysis of variance		
There are 9 active loci		
Two-level analysis		
1 active population		
Locus	Allele	f
Akom4	All	0.167839
Akom7	All	0.091445
Akom8	All	0.197263
Akom9	All	-0.190736
Akom10	All	0.206897
Akom11	All	0.206780
Akom12	All	0.232000
Akom13	All	0.074860
Akom14	All	0.223181
Overall	---	0.143493

A endogamia pode ser mais uma das causas para explicar a ausência de heterozigotos esperados em nosso estudo, tendo em vista que o valor alto (0,1435) encontrado para o *F_{is}*, indica um aumento em aproximadamente 15% da taxa de homozigose nessa população devido à junção de alelos idênticos por descendência em um mesmo genótipo. O aumento da frequência de genótipos homozigotos em detrimento da frequência dos genótipos heterozigotos é um dos principais efeitos endogâmicos observado em estudo de populações (HARTL, 2008).

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein *et. al.* (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Calculado no programa GENES, os valores de PIC variaram de 0,2343 à 0,5625 (tabela 9).

Tabela 9: Valores do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) por lócus.

Iniciador	PIC
Akom 4	0,2813
Akom 7	0,4531

Akom 8	0,2812
Akom 9	0,2969
Akom 10	0,2343
Akom 11	0,3594
Akom 12	0,5625
Akom 13	0,2968
Akom 14	0,2968

O valor do PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador por considerar não somente o número de alelos por loco, mas também a frequência relativa desses alelos.

Segundo a classificação de Botstein e colaboradores (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,50 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos e com valores inferiores a 0,25 pouco informativos. Assim, os locos analisados podem ser classificados nos três grupos: altamente informativo Akom 12; mediantemente informativos Akom 4, Akom 7, Akom 8, Akom 9, Akom 11, Akom 13, Akom 14 e pouco informativos Akom 10.

Sendo assim, todos os resultados e discussões descritos nos mostram que estes iniciadores poderão ser utilizados em estudos de populações da espécie *Akodon montensis*. Para isso as sequências dos iniciadores serão futuramente, depositadas em um banco de dados (GenBank) para o acesso de outros grupos de pesquisa.

7 CONCLUSÃO

O isolamento de microssatélites a partir de biblioteca genômica enriquecida, utilizando DNA da espécie de roedor *Akodon montensis*, permitiram as seguintes conclusões:

1. O método CTAB foi satisfatório para obtenção do DNA extraído.
2. A técnica descrita por Refshet *et. al.* (1997) para construção de biblioteca enriquecida de microssatélite mostrou-se eficiente para a espécie.
3. A linhagem bacteriana TOP 10, que permanecia em dormência, armazenada em glicerol à – 20°C, no laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná, encontrava-se em boas condições para início de nova cultura, com bom crescimento bacteriano e sucesso de clonagem;
4. Os oligonucleotídeos (GT) e (GATA) utilizados como sondas para captura de sequências de microssatélites e construção das bibliotecas apresentaram eficiência no genoma de *A. montensis*;
5. Dos 15 iniciadores que foram triados, depois desenhados e testados em uma amostra populacional, nove são polimórficos, informativos e servirão para análise de populações da espécie *A. montensis*, bem como para espécies proximalmente relacionadas.
6. Os desvios estatísticos encontrados em relação a heterozigosidade esperada sugerem a necessidade de análises mais detalhadas na população de *A. montensis* que vive na Floresta Nacional de São Francisco de Paula no estado do Rio Grande do Sul. Espécimes das oito

grades desses 1.6006 hectares de mata devem ser analisados utilizando os nove iniciadores, aumentando o número amostral e auxiliando assim no entendimento na baixa frequência de genótipos heterozigotos encontrados na amostra estudada.

7. A detecção de alelos nulos e o reajuste dos mesmos levam a alterações dos valores de heterozigosidade observada e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e pode ser uma das justificativas para explicar o baixo número de heterozigotos na amostra.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, H. The Bonferonni and Šidák Correction. **Encyclopedia of Measurement and Statistics**. 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERT, K. & WALTER, P.. Molecular biology of the cell. **Book: Garland Science Publishing**. 4th edition. New York. 2002.

ALDRICH, P. R.; HAMRICK, J. L.; CHAVARRIAGE, P. & KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology** (7) 933-944. 1998.

AMOS, W.; SAWCER, S. J.; FEAKE, R. W. & RUBINSZTEIN, D. C. Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. **Nature Genetic**, 13: 390 – 391, 1996.

ANDERSON, S.; JONES J. R.; J. K. Recent mammals of the world: A synopsis of families. New york, **The Ronald Press Company**, 3 –11. 1967.

ANGERS B. & BERNATCHEZ L. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. **Molecular Biology and Evolution**, (14) 230–238. 1997.

AVISE, J. C. Molecular Markers, Natural history and Evolution. **Book: Chapman e Hall**, Nova York. 1994.

BARDELEBEN, C.; PALCHEVSKIY, V.; CALSBEEK, R. & WAYNE R. K. Isolation of polymorphic tetranucleotide microsatellite markers for the brown anole (*Anolis sagrei*). **Molecular Ecology Notes**. 2004.

BECKMANN, J. S. & WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellite. **Genomics**, (12) 627–631. 1992

BIANCHI, N. O.; REIG, O. A.; MOLINA, O. J. & DULOUT, F. N. Cytogenetics of the south american Akodont rodents (Cricetidae). In. A progress report of argentinian and venezuelan forms. **Evolution**, 25: 724-736, 1971.

BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; BRONKEN EIDENSEN, P.; POMPANON, F.; BROCHMANN, C. & TABERLET, P. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. **Molecular Ecology**, (13) 3261 - 3273. 2004.

BONVICINO, C. R., OLIVEIRA, J. A. DE, D'ANDREA, P. S. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Livro: Centro pan-americano de febre aftosa**, Rio de Janeiro, 2008.

BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, (5) 453 – 455. 1996.

BROWN, T. A. Clonagem Genica e análise de DNA. **Livro: Editora ArtMed**. 4° edição, 2003.

CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. I. & MULLEY. J. C. Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **Am J Hum Genet**. (52) 922 – 927. 1993.

CAROL, A. R.; ARCANGELI, L. & BLOCK, A. B. Development of 11 microsatellite loci for population studies in the swordfish *Xiphias gladius* (Teleostei: Scombridae). **Molecular Ecology Notes**, (3) 147–149. 2003.

CHAKRABORTY, R.; DE ANDRADE, M.; DAIGER, S. P. & BUDOWLE, B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. **Annals of Human Genetics**, (56) 45 - 47. 1992.

CHAMBER, G. K. & MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comp. Biochem. Phys. Part B** (126) 445 – 476, 2000.

CHRISTOFF, A. U.; FAGUNDES, V.; SBALQUEIRO, I. J.; MATTEVI, M. S. & YONENAGAYASSUDA, Y. Description of a new species of Akodon

(Rodentia, Sigmodontinae) from southern Brazil. **Journal of Mammalogy**, 81(3) 838 - 851, 2000.

CHRISTOFF, A. U. Contribuição à sistemática das espécies do gênero Akodon (Rodentia: Sigmodontinae) do leste do Brasil: estudos anatômicos, citogenéticos e de distribuição geográfica. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

CHALINE, J; MEIN, P. & PETTER, F. Les grandes lignes d'une classification evolutive des muroides. **Mammalia**, (41) 245 – 252. 1977.

CHAPUIS, M. P. & ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution** (24) 621– 631. 2007.

CRUZ, C. D. Programa Genes - Análise multivariada e simulação. 1. ed. Viçosa, MG: **Editora UFV**. 2006.

COTTERMAN, C. W. Relatives and Human Genetic Analysis. **Scientific Monthly**, (53) 227 - 234. 1941.

COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented population. **Conservation Biology**, 16 (2) 369 – 376. 2001.

DAVIS, D. E. Home ranges of some Brazilian mammals. **Journal of Mammalogy** (26) 119 – 127. 1945.

D'ÉLIA, G. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the Akodont group, and with additional comments on historical Biogeography. **Cladistics**, (19) 307-323. 2003.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer** (19) 11-15. 1987.

EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In *Microsatellites evolution and applications* - Goldstein, D. B & Schlottere, C. **Oxford University Press**, 34 – 48, 1999.

EISENBERG, J. *Mammals of the Neotropics: the Northern Neotropics*. **University of Chicago Press**. 1989.

ELLEGREN, H. Microsatellite mutation in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends Genet.** (16) 551 – 558, 2000.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics** 19 (4) 23 – 29. 1996.

ENGEL, S. R.; LINN, R. A.; TAYLOR, J. F. & DAVIS, S. K. Conservation of microsatellite locos across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy**, 77 (2) 504-518, 1996.

FAGUNDES, V. Análises cromossômicas e dos complexos sinaptonêmicos em roedores brasileiros das famílias Cricetidae e Echimyidae. **Tese de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 1993.

FAGUNDES, V. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (itbs) in recent event of centric fusion. **Chromosome research**, (6) 643 - 648, 1998.

FALCONER, D. S. Introduction of quantitative genetics. **Book: Pearson Prentice Hall**. New York: Ronald. 1964.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. Ed. Brasília. **Livro: Embrapa-cenargen**. 1998.

FIRESTONE, K. B. Isolation and characterization of microsatellites from carnivorous marsupials (*Dasyuridae: Marsupialia*). **Molecular Ecology** (8) 1084 – 1086. 1999.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. & BRISCOE, D. A. A Primer of Conservation Genetics. **Cambridge University Press**. 2004.

GARDNER, A. L. & PATTON, J. L. Karyotypic variation in Oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the neotropical cricetine complex. **Occas. Pap. Mus. Zool.**, (49) 1 - 48, 1976.

GAMARRA DE FOX, I. & MARTIN, A. J. **Lista de mamíferos del Paraguay**. In: O. Romero (ed.), Colecciones de fauna y flora del Museo Nacional de la Historia Natural del Paraguay, 469 - 573. Dirección de Parques Nacionales y Vida Silvestre, Asunción - Paraguay. 1996.

GEISE, L.; SMITH, M. F. & PATTON, J. L. Diversification in the Genus *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) in Southeastern South America: Mitochondrial DNA Sequence Analysis. **Journal of Mammalogy** 82 (1) 92 - 101. 2001.

GEMMELL, N. J.; ALLEN, P. J.; GOODMAN, S. J. & REED, J. Z. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. **Molecular ecology**, (6) 661 - 666, 1997.

GENTILE, R.; D'ANDREA, P. S. & CERQUEIRA, R. Home ranges of *philander frenata* and *Akodon cursor* in Brazilian restinga (Coastal Shrubland). **Mastozoologia neotropical**. (4) 105 - 112, 1997.

GENTILE, R., & R. CERQUEIRA. Movement patterns of five species of small mammals in a Brazilian restinga. **Journal of Tropical Ecology** (11) 671–677. 1995.

GIRARD, P. & ANGERS, B. Characterization of microsatellite loci in longnose dace (*Rhinichthys cataractae*) and interspecific amplification in five other Leuciscinae species. **Molecular Ecology Notes** (6) 69 – 71. 2006.

GLENN T. C. & SCHABLE N. A. Isolating microsatellite DNA loci. **Methods Enzymo**, (395) 202 – 222. 2005

GLICK, B. R & PASTERNAK, J. J. **Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA**. 2° ed. 14 – 16. 1998.

GONGORA, J.; CHEN, Y.; BERNAL, J. E.; NICHOLAS, F. W. & MORAN, C. Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. **Animal genetics**, (33) 312 - 327. 2002.

GRAIPEL, M. E.; CHEREM, J. J.; MILLER, P. R. M. & GLOCK, L. Trapping small mammals in the forest understory: a comparison of three methods. **Mammalia**, (67) 255 – 260. 2003.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C. & GELBART, W. M. An introduction to genetic analysis. **Book: Hardcover**. 7° ed. New York. 2000.

GRIMALDI, M. C., CROUAU-ROY, B. Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. **Journal of Molecular Evolution** (44) 336 – 340. 1997.

GYLDENSTOLPE, N. A manual of neotropical sigmodont rodents. Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens. **Handlingar** 11 (3) 1 - 164. 1932.

HALDANE, J. B. S. & MOSHINSKY, P. Inbreeding in Mendelian populations with special reference to human cousin marriage. **Annals of Eugenics**, (9) 321-340, 1939.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland : Sinauer Associates. 1989.

HARTL, L. D. **Princípios de genética de populações**. Universidade de Harvard. Traduzido por FUNPEC – Editora. 3º ed. São Paulo – SP, 2008.

HEDRICK, P. W. Conservation Genetic: Where are we now. Review: **Trends in Ecology & Evolution**, 16 (11) 269 – 236. 2001.

HERSHKOVITZ, P. Mice of the *Akodon boliviensis* size class (Sigmodontinae:Cricetidae), with the description of two new species from Brazil. **Fieldiana: zool.** (57) 1 - 35, 1990.

HERSHKOVITZ, P. Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genus and six new species. **Bonn. Zool. Beitr**, (47) 193 - 256, 1998.

HORN, G. B., KINDEL, A., HARTZ, A. M. *Akodon montensis* (Thomas, 1913) (Muridae) as a disperser of endozoochoric seeds in a coastal swamp forest of southern Brazil. **Mammalian Biology**, (73) 325 – 329. 2008.

HUDSON R. R. Gene genealogies and the coalescent process. In: Futuyama, D. & Antonovics, J. Editors. Oxford surveys in evolutionary biology. **Oxford: Oxford University Press**. 1 – 44. 1990.

JACOB, C. M.; OLIVEIRA, L. C.; GOLDBERG, A. C.; OKAY, T. S.; GUSHKE, A. K. F.; WATANABE, L. A.; CASTRO, A. P. M.; FOMIN, A. B. F. & PASTORINO, A. C. Polimorfismo de interleucina 10 e persistência da alergia ao leite de vaca. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 33 (3) 93 - 98. 2010.

JACOB, H. J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S. E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R. K.; MAO, Y. P.; GANTEN, D.; DZAU, V. J. & LANDER, E. S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**. 1991.

JARNE, P. & LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution** (11) 424 - 429. 1996

KATTI, M. V.; RANJEKAR, P. K. & GUPTA, V. S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Molecular Biology Evolution**, (18) 1161 - 1167. 2011.

KOVALL, R. A & MATTHEWS, B. W. Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships. **Current Opinion in Chemical Biology**, (3) 578 – 583. 1999.

LANDRY JUNIOR, S. A. The rodentia as omnivores. **Quart. Rev. Biol.** (45) 351 – 372. 1970.

LEWIS, P. O. & ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data. version 1.0. **Software**. 2001.

LIASCOVICH, R. C. & REIG, O. A. Low chromosomal number in *Akodon cursor montensis* (Thomas), and karyologic confirmation of *Akodon serrensis* (Thomas) in Misiones, Argentina. **Journal of Mammalogy**, (70) 391–395. 1989.

LITT, M. & LUTY, J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American journal human genetic**, (44) 398 - 401. 1989.

LU, C. Y.; SUN, X. W.; CAO, J. & LIANG, L. Q. Microsatellite enrichment by magnetic beads in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **J agric biotechnol**, (13) 772–776. 2005.

MALÉCOT, G. Les Mathematiques de L'Herédité. **Masson: Masson**. 1948.

MARTÍNEZ-CRUZ, B.; DAVID, V. A.; GODOY, J. A.; NEGRO, J. J.; O'BRIEN, S. J. & JOHNSON, W. E. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. **Molecular Ecology Note**, (2) 323 – 326. 2002.

MATSUMOTO, T.; YUKAWA, W.; NOZARI, Y.; NAKASHIGE, R.; SHINYA, M.; MAKINO, S.; YAGURA, M.; IKUTA, T.; IMANISHI, T.; INOKO, H.; TAMIYA, G. & GOJOBORI, T. Novel algorithm for automated genotyping of microsatellites. **Nucleic Acids Research**, 32 (20) 6069 - 6077. 2004.

MEGLECZ E., PETENIAN F., DANCHIN E., COEUR D'ACIER A., RASPLUS J. Y, FAURE E. High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. **Molecular Ecology**, (13) 1693–1700. 2004.

MICKOLS, D.A.; FREYER. G.A.; CROTTY, D.A. A ciência do DNA. **Livro: Editora ArtMed**. 2º edição. 108 - 125. 2006

MONDEGO, J. Conceitos de Biologia Molecular. Laboratório de Genômica e Expressão. **Unicamp**. 2008.

MUSSER, G. G. & CARLETON, M. D. Superfamily muroidea. *In*: Mammal species of the world a taxonomic and geographic reference. D. E. Wilson and d. M. Reeder eds. **Johns hopkins university press, Baltimore**. 2005.

MUSSER, G. G. & CARLETON, M. D. Family muridae. *In*: Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. D. E. Wilson and d. M. Reeder, 2nd ed. WashinCAon, **d.c.: smithsonian institution press**, 1993.

McKENNA, M. C. T. A phylogenetic classification of the mammalia. *In* luekett, w. P. And szalay, f. S. Eds. **Phylogeny of the primates**. New York. 21-46. 1975.

MYERS, P. & PATTON, J. L. Akodon of Peru and Bolivia – revision of the femeus group (Rodentia: Sigmodontinae). **Occasional papers of the museum of zoology university of michigan**, (721) 1 – 35. 1989

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; PAÇÓ LARSON, M. L.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M. & RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. São Paulo: faculdade de medicina de Ribeirão Preto (USP), 2003.

NICHOLL, D. S. T. An introduction to genetic engineering. **Book: Cambridge University press**. 3^oed. 2002.

NOGUEIRA, C. D. A. & FAGUNDES, V. Variação genética em *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae) revela dois clados distintos do nordeste e do sul-sudeste com 2n=14, 15 e 16. **Livro de resumos**. III congresso brasileiro de Mastozoologia. 2005.

NOWAK, R. M. & PARADISO, J. L. Walkers' mammals of the world. 4^o Ed. 1983.

NOWAK, R. M. Walker's Mammals of the World. **Book: The Johns Hopkins university press**. Vol. I: 1836. Baltimore and London. 1999.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI M. I.; VENCOVSKY R. & VIEIRA M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genet. And molec. Biol.** 29 (2) 294 - 307. 2006.

ORTEGA. J.; MALDONADO. E.; ARITA. H. T.; WILKINSON. G. S. & FLEISCHER. R. C. Characterization of microsatellite loci in the Jamaican fruit-eating bat *Artibeus jamaicensis* and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes** (2) 462 – 464. 2002.

PARDINAS, U.; D'ELIA, G.; FAGUNDES, V.; CHRISTOFF, A. & GEISE, L. *Akodon montensis*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. 2008.

PARDINAS, U. F. J.; TETA, P.; CIRIGNOLI, S. & PODESTA, D. H. Micromamíferos (Didelphimorphia y Rodentia) de Norpatagonia Extra Andina, Argentina: Taxonomía Alfa y Biogeografía. **Mastozoología Neotropical** 10 (1) 69 - 113. 2003.

PATTERSON, B. D. Patterns and trends in the discovery of new neotropical mammals. **Diversity and distributions**, (6) 145-151. 2000.

PEMBERTON, J. M.; SLATE, J.; BANCROFT, D. R. & BARRETT J. A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology** (4) 249 – 252. 1995.

POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E. & TABERLET, P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Reviews – Genetics**, (6) 847 - 859. 2005.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C. & PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science** (1) 215 - 222. 1996.

PRIMMER, C. R.; ELLERGEN, H.; SAINO, N. & MOLLER, A. P. Directional evolution in germline microsatellite mutations. **Natural Genetic** (13) 391 – 393. 1996.

PÜTTKER, T.; MEYER-LUCHT, Y. & SOMMER, S. Movement distances of five rodent and two marsupial species in forest fragments of the Coastal Atlantic Rainforest, Brazil. **Ecotropica** (12) 131 – 139. 2006.

REECE, K. S.; RIBEIRO, W. L.; GAFFNEY, P. M.; CARNEGIE, R. B. & ALLEN, S. K. Jr. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. **Journal of Heredity**, (95) 355 – 361. 2004.

REFSETH, U. H; FANGAN, B. M. & JAKOBSEN, K. S. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. **Electrophoresis**, (18) 1519 - 1523. 1997.

REIG, O. A. A proposed unified nomenclature for the enamel components of the molar teeth of the Cricetidae (Rodentia). **Journal of Zoology**, (181) 227 – 241. 1977.

REIG, O. A. Teoria del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de america del sur. **Mus. Munic. Cienc. Nat.** “lorenzo scaglia”, (1) 1 – 161. 1981.

REIG, O. A. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sul americanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Brazilian Journal of Genetics**, (7) 333 – 365. 1984.

REIG, O. A. An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with the description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae: Sigmodontinae). **Fieldiana Zoology**, (39) 347 – 399. 1987.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. & LIMA, I. P. de. Mamíferos do Brasil. **Livro:UEL**. 1ªed. Londrina - PR. 2006.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**. (43) 223 - 225. 1989.

ROQUES, S.; DUCHESNE, P. & BERNATCHEZ, L. Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. **Molecular Ecology** (8) 1703–1717. 1999.

RORATTO, P. A.; BARTHOLOMEI-SANTOS M. L. & FREITAS T. R. O. Tetranucleotide microsatellite markers in *Ctenomys torquatos* (Rodentia). **Conservation Genet Resour**, (3) 725–727. 2011.

ROZEN, S. & SKALETSKY, H. J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. **Humana Press**, Totowa, 365 – 386. 2000.

RUBINSZTEIN, D. C.; AMOS, W.; LEGGO, J.; GOODBURN, S.; JAIN, S.; LI, S.; MARGOLIS, R. L.; ROSS, C. A. & FERGUSON-SMITH, M. A. Microsatellite evolution – evidence for directionality and variation in rate between species. **Nature genetics**, (10) 337 – 343. 1995.

SARAGE, R. J. G. & LONG, M. R. Mammal evolution. **Book: British museun (natural history)**. Cromwell road, London. (9) 113-129.1986.

SBALQUEIRO, I. J. Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da região sul. Porto Alegre. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1989.

SBALQUEIRO, I. J. & NASCIMENTO, A. P. Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia,Cricetidae) with 14, 15 and 16 cromosome cytotypes in the same geographic area in southern Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, 19 (4) 565 – 569. 1996.

SCHLÖTTERER C., TAUTZ D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic acids research**, (20) 211 - 215. 1992.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nat Biotechnol.** 18 (2) 233 - 235. 2000.

SELKOE K. A. & TOONEN R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecol. Lett.** (9) 615 – 629. 2006.

SILVA, A. C. A. Dinâmica de Marcadores Genéticos na Região do Complexo de Histocompatibilidade Principal Humano em Populações do Centro-Oeste do Brasil. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de Brasília. 2012.

SILVA, E. A. Avaliação de um painel de microssatélites para identificação animal/averiguação de paternidade e estrutura genética da população de cavalos da raça mangalarga marchador. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas. 2012.

SILVA, M. J. J. & YONENAGA - YASSUDA, Y. Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. **Cytog. Cell genet.**, (81) 46 – 50. 1998.

SILVA, M. J.; PATTON, J. L. & YONENAGA-YASSUDA, Y. Phylogenetic relationships and karyotype evolution in the sigmodontine rodent *Akodon*

(2n=10 and 2n=16) from Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, (29) 469 - 474. 2006

SIMPSON, G. G. The principles of classification and a classification of mammals. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, (85) 1 – 350. 1945.

SOLE-CAVA, A. M. Biodiversidade Molecular e Genética da Conservação. In: MATIOLO, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. **Livro: Editora Holos**. Ribeirão Preto (17) 172 – 192. 2001.

SONG, G. H.; GENG, J. N.; JIA, R. Y.; YUE, W. B.; LIU, T. F. & HU, S. N. Isolation and characterization of 16 novel microsatellite loci in two inbred strains of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). **Genet. Mol. Res.** 10 (3) 2245 – 2256. 2011.

SOULÉ, M. E. & WILCOX, B. A. Conservation biology: an evolutionary ecological perspective. Sinauer Associates Inc. **Sunderland**. 1980.

SOUSA, M. A.; LANGGUTH, A. & GIMENEZ, E. A. Mamíferos dos brejos de altitude da Paraíba e Pernambuco. In: Porto, K., Cabral, J.J.P., Tabarelli, M. **Livro: Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**. 229 – 254. 2004

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends ecol. Evol.** (15) 199 – 203. 2000

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, (28) 2731 – 2739. 2011.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic acid research**, (17) 6463 - 6471. 1989.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z. & JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, (10) 967 – 981. 2000.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON W. F. & WILLS, D. P. M. MicroChecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol. Ecol. Notes**, (4) 535 – 538. 2004.

VAUGHAN, T. A. Mammalogy. **Book: Philadelphia, Saunders Company**. 2.ed. 1978.

VERA, N. S.; CHIAPPERO, M. B.; PRIOTTO, J. W. & GARDENAL C. N. Isolation of microsatellite loci in *Akodon azarae* (Muridae, Sigmodontinae) and cross-amplification in other Akodontini species. **Journal of Genetics** (90) 25 – 29. 2011.

XIMENEZ, A & LANGGUTH, A. *Akodon cursor montensis* en el Uruguay (Mammalia, Cricetinae). **Com Zool Mus Hist Nat Montevideo** (10) 1 - 7. 1970.

XIN, D.; XIN-BO, C.; SONG-HUA, L.; XIAO-CHUN, W.; YUAN, G.; DONG-FENG, H.; JIN, W. & YU-FU, W. Microsatellite marker enrichment with magnetic beads in flax. **Acta agron sin.** 34 (12) 2099 – 2105. 2008.

WEBER, J. L. & MAY, P. E. Abundance class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **hum.genet.**, (44) 273 - 283. 1989.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**, (56) 330 – 338. 1922.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H. & POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology** (8) 1899 - 1909. 1999.

WOOD, A. E. A revised classification of the rodents. **Journal of Mammalogy** (36) 165 -187. 1955.

WOOD, A. E. Grades and clades among rodents. **Evolution**, (19) 115 - 130. 1965.

YAZBECK, G. M. Genética populacional de peixe migratório. Relatório técnico de estágio em Doutorado do exterior. **UFMG** – Departamento de Farmacologia, 2005.

ZANE L.; BARGELLONI L. & PATARNELLO T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, (11) 1 – 16. 2002.

9 ANEXOS

9.1 RESUMO DOS RESULTADOS

Nome	Sequencia do iniciador	Seq.	Alelo	T°C Anel.	N° de alelos	Alelos	He	Ho	p	PIC
Akom 04	L: CCTCCTCATTCTTTCCACACA R: AATCTTTTCCAGGCAGACA	GT (18)	226	60.00	10	228 – 244	0.89	0.75	0.1731	0,2813
Akom 07	L: TCTCTAACATTGAGGCTAACCAAA R: TTGGCAATTAACACACTGA	CT (32) GT (16)	158	60.00	7	141 – 163	0.80	0.73	0.1140	0,4531
Akom 08	L: TGACTTCATGGAATGCAAA R: CTGCCTTTAGCCCCTTCTTT	GT (15)	208	60.00	10	195 – 227	0.86	0.69	0.0209*	0,2812
Akom 09	L: TCAAAATATGATACCCCTCCAAA R: CCCATTGCATCCACATATCA	GT (24)	250	60.00	4	227 – 245	0.66	0.79	0.4453	0,2969
Akom 10	L: ATAGATGAAGGCAGGCATGG R: TGCTCACCCCAATATATGCAC	GATA (13)	162	60.00	7	148 – 172	0.78	0.62	0.0812	0,2343
Akom 11	L: TGAAACCACATTTGCACACA R: CCATCATCTTTTCATCCCATC	GT (20)	190	60.00	7	170 – 199	0.85	0.68	0.1118	0,3594
Akom 12	L: GCATTTCACTCAGCCTCAGA R: CAGAAGCACTCACCCACTCA	GATA (11)	217	60.00	6	208 - 232	0.85	0.66	0.0571	0,5625
Akom 13	L: TCACACTTATTCCTCTTCCCAAG R: CCACCCACTCTATCTATCCACCT	GATA (10)	296	60.00	7	280 - 312	0.80	0.75	0.3165	0,2968
Akom 14	L: GCCACAGAGAATTGGCATCA R: TTTTCATGACCTCCCCACAAT	GT (17)	203	60.00	10	188 - 214	0.87	0.68	0.0475*	0,2968

Legenda: Seq. = sequência satélite encontrada; Alelo = tamanho do alelo esperado pelo programa PRIMER 3; T°C anel = temperatura de anelamento; N° de alelos = número de alelo encontrado para o loco; Alelos = variação alélica encontrada na população de A. montensis da Floresta Nacional de São Francisco de Paula – RS; He = Heteroziguidade esperada; Ho = heteroziguidade observada; p = valores do equilíbrio de Hardy-Weiberg ($\alpha = 0,5$); PIC = conteúdo de informação polimórfica; * = locos em desequilíbrio.

9.2 SOLUÇÕES

1. TBE 10x

108g de TrisBase

55g de Ácido Bórico

7,5g de EDTA

Adicionar 800ml de água destilada, esperar todos os reagentes dissolverem e completar o volume final para 1 litro.

2. Gel de Poliacrilamida 10%

10ml de solução mãe de acrilamida 30%

20 ml de TBE 1x

400 µl de APS

40 µl de TEMED

3. Solução Mãe de Acrilamida 30%

145g de acrilamida

5g de bisacrilamida

Completar para 500 ml de água destilada.

4. APS 10%

1g de persulfato de amônio

Completar para 10ml de água destilada e aliquotar em microtubos de 1,5ml e armazenar a – 20°C.

5. Azul de Bromofenol 3%

Estoque: 10ml de água destilada

0,300g de bromofenol

Uso: 11ml de estoque

10,35 Glicerol

6. Solução Fixadora do Gel

120ml de álcool comum

6ml de ácido acético

Completar para 1200ml com água destilada.

7. Solução Reveladora do Gel

18g de NaOH

Completar para 800ml de água destilada.

8. Meio LB líquido (100ml)

1g de Peptona

1g de NaCl

0,5g de extrato de levedura

Diluir em metade do volume, completar, ajustar o pH para 7,0 e autoclavar.

9. Meio LB sólido (100ml)

Mesma quantidade dos reagentes do líquido.

Acerta o pH para 7,0

Acrescentar 1,5g de água puro.

Completa o volume para 100ml e autoclava.

10. Cloreto de Cálcio 0,1M

1,47g de CaCl_2

Completar para 100ml com água destilada e filtrar a solução em membrana estéril.

11. Cloreto de Magnésio 0,1M

2,03g de MgCl_2

Completar para 100ml com água destilada e autoclavar.

12. Meio SOC

10g de peptona

2,5g de extrato de levedura

0,25g de NaCl

Agitar. Adicionar 5ml de 250 mM KCl estéril.

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M e completar o volume para 500 ml.

Autoclavar 20 minutos.

Antes do uso: Adicionar 2,5 ml de MgCl_2 2M estéril e 10 ml de glicose 1M estéril.

13. KCl (250mM)

Dissolver 0,93g de KCl em 50 ml de água destilada e autoclavar.

14. MgCl₂ 2M

Dissolver 9,5g de MgCl₂ em 45 ml de água destilada. Ajustar o volume para 50ml e autoclavar.

15. Glicose

3,6g de glicose em 18ml de água destilada. Ajustar o volume para 20ml e filtrar em membrana estéril.

16. Solução de Lise Alcalina I

0,45 g de 50mM de glicose

1,25ml de 25mM de Tris – HCl 1M pH:8,0

1ml de 10mM de EDTA 0,5M pH:8,0

Completar para 50ml de água destilada e autoclavar.

17. Solução de Lise Alcalina II

0,08g de NaOH 0,2N

1,0ml de SDS 10%

Completar para 10ml. Essa solução deve ser preparada somente antes do uso e ser descartada depois

18. Solução de Lise Alcalina III

60ml de acetato de potássio 5M

11,5ml de ácido acético glacial

Completar para 10ml. Manter em temperatura ambiente.

9.3 ARTIGO CIENTÍFICO

Título: “Development and characterization of microsatellite markers in a rodent species of the tribe Akodontini, *Akodon montensis* (Rodentia : Muridae).”

Revista: Molecular Ecology Resources.

1 **Desenvolvimento e caracterização de marcadores**
2 **microssatélite em uma espécie de roedor da tribo Akodontini,**
3 ***Akodon montensis* (Rodentia: Muridae).**

4

5 Shenia P.B. da Silva¹; Thales Renato O. de Freitas²; Iris Hass³.

6 1. Programa de Pós Graduação em Genética – Departamento de Genética – UFPR.

7 2. Professor Dr. do Departamento de Genética – UFRGS.

8 3. Professora Dra. do Departamento de Genética – UFPR.

9

10 **RESUMO:** Nós isolamos e caracterizamos nove iniciadores microssatélites
11 para a espécie *Akodon montensis*, utilizando duas bibliotecas enriquecidas
12 (GT) e (GATA) por meio de uma técnica não invasiva com sondas biotiniladas e
13 esferas recobertas por estreptavidina. Estes loci foram caracterizados
14 utilizando uma amostra de 24 indivíduos que apresentaram o número de alelos
15 por locus variando de 4 a 10, com uma média de 7,5. A heterozigosidade
16 observada e esperada variaram de 0,6250 – 0,7916 e 0,6675 – 0,8980,
17 respectivamente e apenas sete dos nove loci encontrou-se em equilíbrio de
18 Hardy-Weinberg. O coeficiente de endogamia (*F_{is}*) foi igual a 0,1435 e o
19 Conteúdo de informação Polimórfica (PIC) variou de 0,2343 à 0,5625.

20

21 **PALAVRAS-CHAVE:** Microssatélite, Conservação, Variabilidade genética,
22 Roedor.

23

24 Correio eletrônico do autor: shenia.silva@yahoo.com.br

25

Molecular Ecology Resources

26 *Akodon montensis* é uma espécie de roedor da tribo Akodontine,
27 encontrado principalmente no Sul da América do Sul, do Leste ao Sul do
28 Paraguai (GAMARRA DE FOX & MARTIN, 1996), no Nordeste da Argentina
29 (PARDINÃS *et. al.*, 2003), no Sudeste e Leste do Brasil - que vai do Rio
30 Grande do Sul ao Rio de Janeiro (CRISTOFF 1997; FAGUNDES, 1993,
31 LIASCOVICH & REIG 1989, RIEGER; LANGGUTH & WEIMER, 1995),
32 incluindo as configurações de Mata Ciliar em Minas Gerais e Goiás (GEISE;
33 SMITH & PATTON, 2001; RIEGER; LANGGUTH & WEIMER, 1995).
34 Pesquisas indicam que apesar de ainda não estarem ameaçados de extinção,
35 esta espécie está sofrendo um decréscimo populacional (IUCN). O objetivo do
36 trabalho foi desenvolver marcadores moleculares microsatélite, que permitem
37 analisar a diversidade genética dentro das populações desta espécie e
38 desenvolver estratégias de manejo para conservação quando necessário.

39 Microsatélites são marcadores moleculares co-dominantes formados
40 por sequências repetidas de um a seis pares de bases de comprimento
41 dispostas em *tandem* (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989; TAUTZ, 1989;
42 JACOB *et. al.*, 1991). Encontrados em alta frequência e com ampla distribuição
43 nos genomas de eucariotos (TÓTH, GÁSPARI; JURKA, 2000), são de grande
44 utilidade para analisar a variabilidade genética dentro e entre espécies e
45 populações, inferir a história evolutiva e a estrutura populacional (ENGEL *et.*
46 *al.*, 1996; GEMMELL *et. al.*, 1997; GONGORA *et. al.*, 2002).

47 O DNA genômico total de *A. montensis* foi extraído utilizando o método
48 CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987) e os microsatélites foram isolados de acordo
49 com o protocolo descrito por *Refseth et. al.* (2007). O DNA foi digerido com a
50 enzima de restrição TaqI e ligado a adaptadores formado pelo anelamento de

Molecular Ecology Resources

51 dois oligonucleotídeos (TaqI 20 Mer: 5'-ATGAAGCCTTGGTACTGGAT-3' and
52 TaqI 22 Mer: 5'-CGATCCAGTACCAAGGCTTCAT-3'). Os fragmentos foram
53 hibridizados com sondas biotinizadas (GT)_n - (GATA)_n e capturados por esferas
54 magnéticas recobertas por estreptavidina (Dynabeads® M-280). O DNA
55 selecionado e composto por sequências repetidas foi eluído em fita simples e
56 amplificado em uma Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando o
57 oligonucleorídeo TaqI 20 Mer como iniciador em uma reação de 25µl finais
58 composta por 10,0µl de DNA eluído; 2,5µl de tampão 10x; 4,0µl de MgCl₂
59 25mM; 1,0µl de dNTPs 10mM; Iniciador TaqI 20Mer 5µM; 0,25µ de Taq DNA
60 polimerase 5U/µl. As condições de amplificação foram: 95°C por 5 min, 27
61 ciclos de 95°C por 1 min, 61°C for 30 s, 72°C for 2 min e uma extensão final de
62 8 min a 72°C. Os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 0,8%,
63 inseridos em um vetor plasmidial pJET1.2/blunt e transferidos para células
64 competentes de *Escherichia coli* através de transformação por choque térmico.

65 O plasmídeo de clones recombinantes presentes na cultura bacteriana
66 forma extraídos e sequenciados utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator
67 Cycle Sequencing kit for MegaBACE (Amershan Bioscience). As seqüências
68 dos locos de microssatélites obtidas foram primeiramente alinhadas através do
69 programa MEGA 5.1 *beta* (TAMURA *et. al.*, 2011), analisadas no ClustalW para
70 semelhança de clones e posteriormente submetidas ao programa PRIMER3
71 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) para projeção dos iniciadores. Um total de 50
72 clones foram sequenciados e 33 deles apresentaram sequência de
73 microssatélite, 14 para sonda GT e 19 para sonda GATA. No programa
74 Primer3, 28 dos 33 clones, apresentaram suas extremidades longas o
75 suficiente para a projeção de um iniciador. Quinze foram escolhidos para

Molecular Ecology Resources

76 síntese, doze de repetição GT e três de repetição GATA, a escolha dos loci
77 foi baseada no número de repetições, na variação do número de alelos e no
78 tamanho dos alelos.

79 Como estratégia de marcação fluorescente para análise dos iniciadores
80 em método semiatumizado (MegaBace1000), foi utilizado a fluorescência
81 Universal, de sequência M13(-21) com coloração FAM (SCHUELKE, 2000).
82 Dos 15 iniciadores, quatro deles não apresentaram sucesso de amplificação
83 (Akom 1, Akom 2, Akom 3 e Akom 15) e dois apresentaram picos extras
84 impossibilitando a análise dos alelos (Akom 5 e 6). Os nove iniciadores
85 restantes foram testados em 24 indivíduos provenientes da Floresta Nacional
86 de São Francisco de Paula no estado do Rio Grande do Sul. As condições da
87 PCR seguem no volume final de 20µl: 2,0µl de tampão 10x; 0,8µl de MgCl₂
88 25mM; 2,0 de dNTP 10mM; 0,2µl de iniciador forward 10mM; 0,5 de iniciador
89 reverse; 0,5µl de iniciador universal (FAM); 0,2µl de Taq DNA polimerase 5U/µl;
90 3,0µ de DNA 20ng/µl e 10,8µl de água ultra pura. As condições de amplificação
91 seguem: (anelamento do iniciador específico) 95°C por 5 min; 26 ciclos de
92 95°C por 40s; 60°C por 1min; 72°C por 40s; (anelamento da fluorescência
93 universal) 94°C por 5min; 8 ciclos de 94°C por 40s; 53°C por 40s; 72°C por 40s
94 seguido de uma extensão final de 72°C por 5min.

95 Os alelos foram analisados no programa Fragmente Profiler version 1.2 (GE
96 Healthcare) e todos os nove iniciadores mostraram-se polimórficos, com o
97 número de alelos variando de 4 à 10 dependendo do locus, apresentando uma
98 média de 7,5 alelos por locus. A heterozigidade observada e esperada, o
99 equilíbrio de Hardy-Weinberg e o *F_{is}* foram calculados no programa DGA -
100 *Genetic Data Analyses* - versão 1.0 (LEWIS; ZAYKIN, 2001). As análises feitas

Molecular Ecology Resources

101 no programa MicroChecker,, detectam alelos nulos para os locos Akom 7,
102 Akom 8, Akom 11, Akom 12 e Akom 14, que tiveram o número de genótipos
103 homozigotos ajustados para refletir as estimativas reais do número de
104 homozigotos na população, sendo introduzido um valor zero para substituir um
105 dos valores de alelos homozigotos, torando-os heterozigotos (VAN
106 OOSTERHOUT; HUTCHINSON; WILLS, 2006). Depois da correção dos alelos
107 nulos, a média de todos os locos para a H_e foi de 0,8125 e para H_o foi de
108 0,6065. Os valores de p foram superiores ao valor de α (0,05) para 7 dos 9
109 locos estudados, apresentando desvios do equilíbrio apenas Akom 8 e Akom
110 14. O coeficiente de endogamia (F_{is}) que foi avaliado em 0,1435, implica em
111 aproximadamente 15% de aumento na taxa de homozigose da população,
112 devido à junção de alelos idênticos por descendência em um mesmo genótipo.
113 O conteúdo de informação polimórfica (PIC) analisado no programa GENES
114 (CRUZ, 2006) fornecendo uma estimativa do poder discriminatório do iniciador,
115 que foi avaliado como pouco informativo ($< 0,25$) para Akom 10; mediamente
116 informativo ($< 0,50$ e $> 0,25$) para Akom 4, Akom 7, Akom 8, Akom 9, Akom 11,
117 Akom 13 e Akom 14; e muito informativo ($<0,50$) para Akom 12.

118 A tabela 1 mostra os dados dos nove marcadores com sucesso de
119 amplificação e análise. Estes agora podem ser utilizados em estudos de
120 populações, conservação e evolução de *Akodon montensis*.

121

122 Tabela 1: Dados dos nove iniciadores encontrados para *Akodon montensis*.

Nome	Sequencia do iniciador	Seq.	Alelo	T°C Anel.	N° de alelos	Alelos	He	Ho	p	PIC
Akom 04	L: CCTCCTCATTCTTTCCACACA R: AATCTTTTCCAGGCAGACA	GT (18)	226	60.00	10	228 - 244	0.89	0.75	0.1731	0,2813

Molecular Ecology Resources

Akom 07	L: TCTCTAAACATTGAGGCTAACCAAA R: TTGGCAATTAACACACTGA	CT (32) GT (16)	158	60.00	7	141 - 163	0.80	0.73	0.1140	0,4531
Akom 08	L: TGACTTCATGGGAATGCAAA R: CTGCCTTTAGCCCCTTCTTT	GT (15)	208	60.00	10	195 - 227	0.86	0.69	0.0209*	0,2812
Akom 09	L: TCAAAATATGATACCCCTCCAAA R: CCCATTGCATCCACATATCA	GT (24)	250	60.00	4	227 - 245	0.66	0.79	0.4453	0,2969
Akom 10	L: ATAGATGAAGGCAGGCATGG R: TGCTCACCCCAATATATGCAC	GATA (13)	162	60.00	7	148 - 172	0.78	0.62	0.0812	0,2343
Akom 11	L: TGAAACCACATTTGCACACA R: CCATCATCTTTTCATCCCATC	GT (20)	190	60.00	7	170 - 199	0.85	0.68	0.1118	0,3594
Akom 12	L: GCATTTCACTCAGCCTCAGA R: CAGAAGCACTCACCCACTCA	GATA (11)	217	60.00	6	208 - 232	0.85	0.66	0.0571	0,5625
Akom 13	L: TCACACTTATTCCTCTTCCCAAG R: CCACCCACTCTATCTATCCACCT	GATA (10)	296	60.00	7	280 - 312	0.80	0.75	0.3165	0,2968
Akom 14	L: GCCACAGAGAATTGGCATCA R: TTTTCATGACCTCCCCACAAT	GT (17)	203	60.00	10	188 - 214	0.87	0.68	0.0475*	0,2968

123 Legenda: Seq. = sequência satélite encontrada; Alelo = tamanho do alelo esperado pelo programa
 124 PRIMER 3; T°C anel = temperatura de anelamento; N° de alelos = número de alelo encontrado para o
 125 loco; Alelos = variação alélica encontrada na população de *A. montensis* da Floresta Nacional de São
 126 Francisco de Paula – RS; He = Heterozigosidade esperada; Ho = heterozigosidade observada; p =
 127 valores do equilíbrio de Hardy-Weiberg ($\alpha = 0,5$); PIC = conteúdo de informação polimórfica; * = em
 128 equilíbrio de HWB após a correção de Bonferroni; ** = desviado do equilíbrio de HWB.

129

130 AGRADECIMENTOS: Ao Laboratório de Citogenética Animal do Departamento
 131 de Genética UFPR pelo espaço, ao Laboratório de Citogenética e Evolução do
 132 Departamento de Genética da UFRGS pelas amostras cedidas, ao Laboratório
 133 de Diversidade Animal da UFSM pelo aprendizado e isolamento dos
 134 microssatélites. Ao REUNI e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

135

136 REFERÊNCIAS:

Molecular Ecology Resources

137 CRUZ, C. D. . Programa Genes - Análise multivariada e simulação. 1.
138 ed. Viçosa, MG: **Editora UFV**. (1) 175. 2006.

139 DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small
140 quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer** (19) 11-15. 1987.

141 ENGEL, S. R.; LINN, R. A.; TAYLOR, J. F.; DAVIS, S. K. Conservation of
142 microsatellite locos across species of artiodactyls: implications for population
143 studies. **Journal of mammalogy**, 77(2): 504-518, 1996.

144 JACOB, H. J., LINDPAINTNER, K., LINCOLN, S.E., KUSUMI, K.,
145 BUNKER, R.K., MAO, Y.P., GANTEN, D., DZAU, V.J., LANDER, E.S. Genetic
146 mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously
147 hypertensive rat. **Cell** 67, 1991.

148 LEWIS, P. O. & ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: computer program
149 for the analysis of allelic data. version 1.0. 2001.

150 LITT, M.; LUTY, J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro
151 amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene.
152 **American journal human genetic**, 44: 398:401. 1989.

153 GAMARRA DE FOX, I. AND MARTIN, A. J.. **Lista de mamiferos del**
154 **Paraguay**. In: O. Romero (ed.), Colecciones de fauna y flora del Museo Nacional de la
155 Historia Natural del Paraguay, p. 469-573. Direccion de Parques Nacionales y Vida
156 Silvestre, Asuncion, Paraguay, Asuncion, Paraguay. 1996.

157 GEMMELL, N.J.; ALLEN, P.J.; GOODMAN, S.J.; REED, J.Z.
158 Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations.
159 **Molecular ecology**, 6: 661-666, 1997.

160 GONGORA, J.; CHEN, Y.; BERNAL, J.E.; NICHOLAS, F.W.; MORAN, C.
161 Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine
162 primers. **Animal genetics**, 33: 312-327, 2002.

Molecular Ecology Resources

- 163 PARDINAS, U. F. J., TETA, P., CIRIGNOLI, S. AND PODESTA, D. H.
164 Micromamíferos (Didelphimorphia y Rodentia) de Norpatagonia Extra Andina,
165 Argentina: Taxonomía Alfa y Biogeografía. **Mastozoología Neotropical** 10(1):
166 69-113. 2003.
- 167 REFSETH UH, FANGAN B M & JAKOBSEN K S. Hybridization capture
168 of microsatellites directly from genomic DNA. **Electrophoresis**, 18: 1519-1523.
169 1997.
- 170 ROZEN S, SKALETSKY HJ. Primer3 on the www for general users and
171 for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics
172 methods and protocols: methods in molecular biology. **Humana Press**, Totowa,
173 365–386, 2000.
- 174 SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR
175 fragments. **Nat Biotechnol**. 18 (2) 233-235. 2000.
- 176 TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M,
177 KUMAR S. Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum
178 likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular**
179 **Biology and Evolution** 28: 2731 – 2739. 2011.
- 180 TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for
181 polymorphic DNA markers. **Nucleic acid research**, 17:6463-6471. 1989.
- 182 TÓTH, G., GÁSPARI, Z., JURKA, J. Microsatellites in different
183 eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research** 10: 967-81, 2000.
- 184 VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON W. F. & WILLS, D. P. M.
185 MicroChecker: software for identifying and correcting genotyping errors in
186 microsatellite data. **Mol. Ecol. Notes**, (4) 535 – 538. 2004.

Molecular Ecology Resources

187 WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundance class of human DNA
188 polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction.
189 **hum.genet.**, 44:273-283. 1989.