

Notice

This translation is machine-generated. It cannot be guaranteed that it is intelligible, accurate, complete, reliable or fit for specific purposes. Critical decisions, such as commercially relevant or financial decisions, should not be based on machine-translation output.

DESCRIPTION CN102465181A

Goat paternity identification method and its microsatellite primer and kit

[0001]

Technical field

[0002]

The invention belongs to the field of animal breeding, and particularly relates to a method for paternity identification of goats and its microsatellite primer and a kit.

[0003]

Background technique

[0004]

In modern animal breeding, due to the use of phenotypic information of various relatives, accurate genealogical records are very important. However, in some cases people cannot accurately identify the fathers of individual goats. Practical examples include grazing. Lambs from raised ewes, as well as offspring from mixed semen insemination and lambs from ewes that have been compounded with multi-bred rams. These inaccurate pedigree records are likely to lead to genetic progress in breeding. slow.

Therefore, the pedigree confirmation of breeding rams is even more important.

Therefore, it is necessary to correct the errors in genealogical records through paternity testing to ensure that as much genetic progress as possible is obtained.

At present, the use of traditional blood group factors for goat paternity testing is not effective and the accuracy of the identification results is low, especially for some breeding rams with extremely high breeding value. When they are siblings or paternity, it is necessary to achieve high accuracy Rate is more difficult. There is an urgent need to adopt new genetic markers to effectively solve this problem. With the development of molecular biotechnology, the genetic markers used in paternity testing have also evolved from the original biochemical markers to molecular markers. Among many molecular markers, microsatellite markers have become the most widely used molecule in paternity testing due to their own advantages. Marker (Application of Microsatellite DNA in Jirong Rabbit Paternity Test, 2005, Heredity; Using 10 STR-DNA polymorphisms for police dog paternity test, 2005, Journal of Jiangxi Agricultural University; SSR marker to identify the paternity of corn varieties Research, 2009, Anhui Agricultural Sciences; etc.).

[0005]

Microsatellites were discovered in 1980 and later became a widely used molecular genetic marker. A large number of microsatellites have been used in researches such as human, animal and plant genetic variation, origin and evolution, molecular diagnosis of genetic diseases, and genetic mapping. Satellite tag.

Microsatellite markers have the following advantages: ① High individual identification probability and non-paternal exclusion probability. Because it is widely distributed in human and animal genomes and has small fragments, compared with traditional protein genetic markers, it has more alleles and heterozygosity. High, therefore, different individuals are more likely to have

different genotypes. ② It is easier to explain its inheritance mode and mutation mode. ③ The amount of samples is small, the sensitivity and success rate are high, and it is suitable for biological samples from various sources. A small amount of samples can meet the requirements of DNA extraction. The extracted DNA is amplified by PCR, and the sensitivity is higher than traditional DNA fingerprints. Much. Due to the short length of the PCR amplification film, even if it contains only degraded DNA old spots, its amplification efficiency is still high, so it can be applied to samples from various sources. Based on the above advantages, microsatellite marker typing is considered to be the core of the second-generation forensic DNA fingerprinting technology, and is currently the main development direction of individual identification and paternity identification. With the deepening of research on microsatellite markers, it has been introduced into the pedigree identification of cattle and sheep (using microsatellite DNA technology for sheep paternity testing, 2005, Journal of Anhui Agricultural University; 15 microsatellite loci were used for paternity of Holstein cows Identification, 2010, Shandong Animal Husbandry and Veterinary; etc.), Wang Jie et al. used 10 microsatellite loci for paternity testing of tall prototype Tibetan goats (Research on the application of microsatellite DNA in parentage identification of tall prototype Tibetan goats, 2010, Southwest University for Nationalities Journal), but Chongming goats belong to the Yangtze River Delta white goats with breed specificity. This system is not suitable for Chongming goat paternity testing. Therefore, it is necessary to establish a suitable Chongming goat paternity testing system by screening microsatellite markers.

[0006]

Summary of the invention

[0007]

The purpose of the present invention is to provide a method for paternity identification of goats by using microsatellite labeling technology.

The method of the invention is simple, fast, low in cost and high in accuracy.

[0008]

Another object of the present invention is to provide microsatellite primers for the above goat paternity identification method.

[0009]

The third objective of the present invention is to provide a kit for the above goat paternity identification method.

[0010]

The technical scheme adopted by the present invention is as follows:

[0011]

The present invention provides a method for paternity identification of goats using microsatellite labeling technology. The method includes the following steps:

[0012]

(1)Take blood samples from goat breeds for DNA extraction and testing;

[0013]

(2)Selection of microsatellite sites: select microsatellite sites with stable PCR amplification results, clear bands, polymorphisms and no non-specific amplification;

[0014]

(3)Use each microsatellite site to perform PCR amplification on different goat DNA templates, and perform electrophoresis detection on the amplified fragments;

[0015]

(4)Genetic polymorphism analysis of microsatellite loci.

[0016]

Said goat is selected from Chongming goat.

[0017]

The PCR amplification system: a 10ul reaction system is used, in which 10×PCR Buffer (Mg²⁺+Free) 1ul, 10mmol/LdNTPs (deoxynucleotide triphosphate mixed solution) 0.8ul, 25mmol/L MgCl₂0.6ul, 20umol/ 0.25ul each of the primers on both sides of L, 0.5U Taq DNA polymerase (thermophilic DNA polymerase), 10ng template, and make up 10ul with ultrapure water.

[0018]

Amplify with a PCR amplification instrument. The PCR amplification reaction program is: 94°C pre-denaturation for 5 min→(94°C denaturation for 30s, 55 ~ 58°C annealing for 45s, 72°C extension for 30s)×30→72°C7min→4°C storage .

[0019]

The electrophoresis is 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

[0020]

The microsatellite primers include the following primer pairs:

[0021]

1)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of Sequence 1 and Sequence 2 in Table 1;

[0022]

2)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 3 and sequence 4 in Table 1;

[0023]

3)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 5 and sequence 6 in Table 1;

[0024]

4)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 7 and sequence 8 in Table 1;

[0025]

5)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 9 and sequence 10 in Table 1;

[0026]

6)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 11 and sequence 12 in Table 1;

[0027]

7)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 13 and sequence 14 in Table 1;

[0028]

8)A primer pair consisting of the nucleotide sequences of Sequence 15 and Sequence 16 in Table 1.

[0029]

The primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 1 and sequence 2 in the sequence listing is named LSCV043. Sequence 1 in the sequence listing consists of 23 bases, and sequence 2 in the sequence listing consists of 22 bases; The primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 3 and sequence 4 in the list is named BMS1724. Sequence 3 in the sequence list consists of 20 bases, and sequence 4 in the sequence list consists of 21 bases; it will be composed of sequences 5 and The primer pair consisting of the nucleotide sequence of sequence 6 is named BM6526, the sequence 5 in the sequence list consists of 20 bases, the sequence 6 in the sequence list consists of 22 bases; it will consist of the nucleosides of sequence 7 and sequence 8. The primer pair consisting of the acid sequence is named Oarfc48, the sequence 7 in the sequence list consists of 26 bases, the sequence 8 in the sequence list consists of 28 bases; the primers that

will consist of the nucleotide sequences of sequence 9 and sequence 10. The pair is named BMS1248, the sequence 9 in the sequence listing consists of 20 bases, and the sequence 10 in the sequence listing consists of 21 bases; the primer pair consisting of the nucleotide sequences of sequence 11 and sequence 12 is named BMS1678, Sequence 11 in the sequence list is composed of 21 bases, sequence 12 in the sequence list is composed of 20 bases; the primer pair consisting of the nucleotide sequence of sequence 13 and sequence 14 is named BMS574, the sequence in the sequence list 13 is composed of 22 bases, sequence 14 in the sequence list is composed of 22 bases; the primer pair composed of nucleotide sequences of sequence 15 and sequence 16 is named BMS875, sequence 15 in the sequence list is composed of 19 bases. Base composition, sequence 16 in the sequence list consists of 20 bases.

[0030]

The genetic polymorphism analysis of the microsatellite loci includes statistics of the number of alleles and the number of effective alleles; heterozygosity and polymorphism information content; exclusion probability and cumulative exclusion probability.

The present invention provides a kit for use in the method for paternity testing of goats, which contains the above-mentioned microsatellite primer for paternity testing of goats.

[0031]

According to the actual situation, the kit further contains various reagents for PCR reaction: TaqDNA polymerase, 10×PCRBuffer, dNTPs, redistilled water, MgCl₂.

[0032]

The solvents of the various reagents mentioned above are all water.

[0033]

When primer synthesis, genomic DNA extraction, dNTPS and TaqDNA polymerase reagents come from different batches, PCR reaction conditions, including annealing temperature, will change to a certain extent.

Therefore, before each large-scale PCR, a small number of individuals must be selected for temperature gradient, primer concentration gradient PCR, 2% agarose gel electrophoresis, and the amplification effect to determine the best PCR reaction conditions.

In addition, after determining the PCR annealing temperature (T_m) of a single labeled primer, you can appropriately combine some primers according to the size of the PCR product, and then explore the conditions of the multiple PCR reaction.

Since the target product fragment corresponding to the primers used does not exceed 300 bp, the extension time in the cycle is controlled at about 45 seconds.

[0034]

Compared with the prior art, the present invention has the following advantages and beneficial effects:

[0035]

1、The identification method of the present invention is simple, fast, low in cost, and high in accuracy.

[0036]

2、

According to this method, a corresponding test kit was developed for the paternity test of goats. The kit has the advantages of simple, fast and sensitive method of use, does not require special equipment, and is suitable for the needs of routine laboratory testing. The detection result is reliable, stable and accurate, which provides convenience for goat breeding.

The invention will play an important role in the microsatellite paternity identification of Chongming goats and the molecular selection of excellent breeding sheep, and has broad application prospects.

[0037]

Description of the drawings

[0038]

Figure 1 shows the result of 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of LSCV043 PCR amplification product.

[0039]

Figure 2 shows the result of 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of the BM6526 PCR amplified product.

[0040]

Figure 3 shows the result of 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of the PCR amplification product of Oarfb48.

[0041]

Figure 4 shows the results of 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of BMS1724 PCR amplification products.

[0042]

Figure 5 shows the results of 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of BMS574 PCR amplification products.

[0043]

detailed description

[0044]

The present invention will be further described below in conjunction with the embodiments shown in the drawings.

[0045]

The methods used in the following examples are conventional methods unless otherwise specified.

The synthesis of the primers used was completed by Shanghai Jierui Industrial Biotechnology Service Co., Ltd.

[0046]

Example 1. Screening of microsatellite primers for paternity testing of Chongming goats

[0047]

1. Selection of Microsatellite Markers

[0048]

According to the existing literature and other related research results (microsatellite genetic diversity analysis of six Chinese indigenous goat breeds, 2004; microsatellite analysis of genetic diversity of 10 goat breeds in China, 2008), a total of the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO)) The recommended 58 microsatellite loci, their complete nucleotide sequence, primer sequence, PCR reaction conditions, population polymorphism information and chromosome genetic map position, etc. can be obtained from the following website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

All primers were synthesized by Shanghai Jierui Bioengineering Co., Ltd. 19 pairs of primers with clear amplified bands and good repeatability were screened out. The specific information is shown in Table 1.

[0049]

Table 1 Primer sequence, repeat type, annealing temperature and Genbank number

[0052]

2. Genotype detection of microsatellite markers

[0053]

The 19 pairs of microsatellite loci obtained in step 1 were used to perform microsatellite genotype detection on 79 ewes and 46 rams in Chongming Breeding Farm, a total of 125 Chongming goats. The specific method includes the following steps:

[0054]

1、PCR amplification

[0055]

Take 10ml of goat blood from jugular vein, ACD (sodium citrate anticoagulant) anticoagulant, and store at -20°C.

Genomic DNA was extracted using whole blood genomic DNA extraction kit (Shanghai Cypress Gene Technology Co., Ltd.), and its quality and concentration were tested by 0.6% agarose gel electrophoresis and UV spectrophotometer (Beckman DU800), and stored at -20°C for later use. .

Then use the genomic DNA as a template to perform PCR amplification on 19 pairs of primers. PCR uses a 10ul reaction system, of which 10×PCR Buffer (Mg²⁺+Free) 1ul, 10mmol/L dNTP 0.8ul, 25mmol/L MgCl₂0.6ul, 0.25ul each of the primers on both sides of 20umol/L, 0.5U Taq DNA polymerase, 10ng template, and make up 10ul with ultrapure water.

[0056]

The PCR reaction conditions of each microsatellite marker can be shown in Table 2:

[0057]

Table 2 Microsatellite PCR reaction conditions

[0059]

Because primer synthesis, genomic DNA extraction, dNTPS and TaqDNA polymerase reagents come from different batches, the reaction conditions, including annealing temperature, will change to a certain extent.

Therefore, before each large-scale PCR, a small number of individuals must be selected for temperature gradient, primer concentration gradient PCR, 2% agarose gel electrophoresis, and the amplification effect to determine the best PCR reaction conditions.

In addition, after determining the annealing temperature (T_m) of the single-label primer PCR, you can appropriately combine some primers according to the size of the PCR product, and then explore the conditions of the multiple PCR reaction.

In addition, since the target product fragment corresponding to the primers used does not exceed 300 bp, the extension time in the cycle is controlled at 45 seconds.

In summary, the PCR amplification reaction program is: 94 °C 5min→(94 °C pre-denaturation 30s, 55 ~ 58 °C annealing 45s, 72°Cextending 30s)×30→72°C7min→4°Cstore.

[0060]

2、Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

[0061]

After the PCR reaction in step 1, the PCR amplified product of each primer pair is detected by 12% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The specific process includes the following steps:

[0062]

① Use clamps to clamp the glass plate that has been sealed with gaskets;

[0063]

② Take 5ml 12% polyacrylamide gel working solution, 6ul TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine), mix quickly, slowly pour it into the sealed glass plate, insert the sample Comb, check whether there are bubbles;

[0064]

③ Polymerize for 30 minutes at room temperature, pull out the spotting comb and the bottom pad, and then fix it on the electrophoresis tank.

[0065]

Wash the gel wells with 1×TBE (1×Tris-boric acid), and pre-electrophoresis at low voltage for 10 minutes;

[0066]

④ Take 7ul each of the amplified PCR products, mix them with the loading buffer at a ratio of 1:7, spot them, and electrophoresis at 75V for 3 hours;

[0067]

⑤ Then perform EB (ethidium bromide) staining for 30 minutes, and record and analyze the electrophoresis results with Tanon2500R gel imaging system.

[0068]

The non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis detection results of some microsatellite markers (LSCV043, BM6526, Oarfcb48, BMS1724, BMS574) are shown in Figure 1-5 (lane M is the standard molecular weight PBR322/Mspl, lanes 1-8 are PCR amplification Increased product), the PCR amplification product of the microsatellite is between 100-300bp, the homozygote labeled by the microsatellite has 1 band, and the heterozygote has 2 bands.

It can be seen from Figure 1 that lanes 1, 3, and 7 are homozygous, and lanes 2, 4, 5, 6, and 8 are heterozygotes, and each heterozygote shows a different genotype.

The 8 lanes in Figure 2 are all heterozygous.

In Figure 3, except for lanes 3 and 7 which are heterozygous, the rest are homozygous, and each homozygous fragment varies in size.

It can be seen from Figure 4 that all lanes are heterozygous, showing two different genotypes, lanes 1 and 3 are the same genotype, and the others are the other.

In Figure 5, lanes 5 and 7 are homozygous, and the rest are heterozygous. Among them, the heterozygotes have 4 genotypes, lanes 1, 2, 3, and 4 are different, lanes 4 and 6 are the same, and lanes 3 and 8 are the same.

[0069]

3. Analysis of genetic polymorphism of microsatellite markers

[0070]

1、Statistics of allele number and effective allele number

[0071]

19

For the microsatellite locus, 301 bands were successfully amplified in 125 goat individuals.

All sites showed polymorphism. Except for the 7 alleles detected by BMS1943, the number of alleles at the other 18 sites was greater than 10. Among them, BMS2508, GC101, BMS1004, LSCV043, and Oarfcb48 all reached 20.

19The average number of alleles observed at each locus is 15.842, and each locus ranges from 7 (BMS1943) to 23 (LSCV043).

Although the number of alleles at each locus varies greatly, there is not much difference between the number of effective alleles at each locus.

The number of effective alleles is also an indicator reflecting the size of genetic variation in the population, expressed as the reciprocal of homozygosity.

If the distribution of alleles in the population is more even, the number of effective alleles is closer to the absolute number of actual alleles detected.

The locus with the smallest effective allele number is BMS1943, which is only 3.365, while the locus with the largest effective allele number LSCV043 has 13.979.

At some loci, although the number of alleles observed is large, the number of effective alleles is small. For example, at locus BMS1004, there are 20 alleles detected, but the number of effective alleles calculated Only 9.818; BMS2508 detected 21 alleles, while the effective number of alleles was 11.038, indicating that the distribution of alleles at these loci was uneven.

In some loci, the number of effective alleles is very close to the absolute value of the number of alleles, such as BM6526, where 16 alleles are observed, and the number of effective alleles is 11.506, indicating that the number of alleles is equal to this locus. The locus distribution is relatively even.

See Table 3 for details.

[0072]

Table 319 microsatellite loci's allele number and effective allele number statistics results

[0075]

2Heterozygosity and polymorphism information content

[0076]

Count the polymorphism information content (PIC) and heterozygosity (Heterozygosity, He) of the above 19 pairs of microsatellite loci.

The calculation formula of PIC is as follows:

[0078]

Pi and Pj are the frequencies of the i-th and j-th alleles, respectively.

[0079]

The calculation formula of heterozygosity (ie expected heterozygosity) is as follows:

[0081]

Where pi is the frequency of the i-th allele.

[0082]

The microsatellite markers selected for paternity testing should meet the following conditions: ① High polymorphic information content (PIC>0.7) and heterozygosity (He>0.9), abundant alleles, 10-12, etc. The best allele; ② The length of the amplified fragment is less than 400bp; ③ The microsatellite markers are located on different chromosomes, or there is no linkage between the markers, and the distance between the markers is greater than 40cM; ④ There is no "dumb allele", the marker Species specificity; ⑤ Good repeatability and stable PCR amplification results.

[0083]

The statistical results of polymorphic information content and heterozygosity are shown in Table 4. Polymorphic information content is an index indicating the degree of microsatellite locus heterogeneity. When PIC>0.5, the locus is a highly polymorphic locus with Highly informative, when $0.25 < \text{PIC} < 0.5$, it is a moderately polymorphic site, and the label can provide more reasonable information; when $\text{PIC} < 0.25$, it is a low-grade polymorphic site, and the label can provide The information is poor.

It can be seen from Table 4 that the PIC range of each point varies between 0.6619-0.9234, and the average value is 0.8766.

The PIC of all sites is above 0.5, which is a highly polymorphic site.

It shows that the selected microsatellite markers are rich in polymorphism and can meet the requirements of individual identification.

[0084]

In addition, the observed heterozygosity of all sites varies widely. The observed heterozygosity of the labeled site BMS1943 is only 0.063, while the observed heterozygosity of the labeled sites BMS1678 and BM6526 is as high as 0.989, and the average observed heterozygosity is 0.6477.

The expected heterozygosity of all loci is basically between 0.703-0.928, with an average value of 0.8815.

The maximum difference between expected heterozygosity and observed heterozygosity is 0.598 (MB023), and the minimum difference is 0.011 (BMS1290); there are 9 markers with a difference of less than 0.2, accounting for 47.36% of the total number of markers, and the observed value of each marker is compared with The difference between the expected value and the observed value is divided by the observed value to obtain a ratio. The highest ratio occurs at the lowest heterozygosity locus BMS1943, which is as high as 10.158, while the lowest ratio is TGLA122, which is only 0.053. Markers with a ratio less than 0.5 have a 12 One, including: BMS574, BMS875, GC101, BMS1004, LSCV043, BMS1290, BMS1248, BMS1678, BM6526, BMS1724, Ofarfc48, BM6404, accounting for 63.16% of all microsatellite markers.

The small difference between the observed value and the expected value further reflects the rationality of microsatellite markers. The distribution of microsatellite marker alleles is relatively reasonable and can accurately reflect the genetic structure of the population.

[0085]

Table 419 observed heterozygosity, expected heterozygosity, polymorphism information content and exclusion probability of 419 microsatellite markers

[0088]

3、Probability of exclusion and cumulative probability of exclusion

[0089]

Evaluation of the practical value of microsatellite markers in paternity testing is mainly reflected by the exclusion probability. The so-called exclusion probability refers to the probability of paternity exclusion (PE) refers to the detection of a certain genetic marker system, which can eliminate the biological father's Controversial opportunities for fathers to exclude, use it to measure the practical value of each genetic marker system in paternity testing.

The size of PE depends on the genetic mode, number of alleles and allele frequency of each system, and has nothing to do with the detected object.

Calculated as follows:

[0091]

Is the number of alleles.

[0092]

In paternity testing, because the elimination probability of a single genetic marker detection system is generally small, it cannot meet the requirements of effectively eliminating unrelated individuals, so multiple genetic marker testing is required to increase the probability of elimination.

The cumulative probability of exclusion (CPE) is:

[0093]

$$CPE = 1 - (1 - PE_1)(1 - PE_2) \dots (1 - PE_i)$$

[0094]

PE and CPE obtained by statistical calculations can optimize the combination of genetic markers, and can screen out genetic marker combinations with high cumulative exclusion probability.

[0095]

In most cases of paternity testing, when the hypothetical father is excluded, the genotypes of the mother and offspring are known, and it is only necessary to compare the genotypes of the mother, offspring and hypothetical father.

The broadest formula for calculating the exclusion probability using n alleles is (JamiesonA. The genetics of transferrin in Cattle[J]Heredity, 1965, (20): 419-441.):

[0097]

In order to simplify and facilitate computer processing, the formula is later rewritten as (Jamieson A. The effectiveness of Using codominant polymorphic allele series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members [J]).

Animal Genetics. 1994, (25, Supp1.1): 37-44.):

[0099]

The exclusion probability of each microsatellite marker was calculated based on the allele frequency. The results are shown in Table 5. The exclusion probability 1 (PE1) refers to when the genotypes of the offspring and the hypothetical parent are known, and the gene of the parent is known. The probability of exclusion when the type is unknown.

The exclusion probability 2 (PE2) is the exclusion probability when the genotypes of the offspring, known parents and hypothetical parents are all known.

[0100]

Since some sites are located on the same chromosome, according to the size of the patriarchal exclusion rate, select the sites with higher patriarchal exclusion rate on the same chromosome, and exclude the five loci BMS2508, GC101, BMS1004, BMS1943, and BMS1290.

[0101]

According to Table 5, the maximum value of the exclusion probability 1 appears at the site LSCV043, and its value is 0.749, and the minimum exclusion probability 1 is 0.5322, which is at the site BM063.

The range of exclusion probability 2 is 0.6975 (position BM063)-0.8562 (position LSCV043), with an average value of 0.647.

[0102]

4、Establishment of microsatellite paternity test system

[0103]

It can be seen from Table 5 that the exclusion rate of a single site is difficult to meet the requirements of paternity testing.

In this study, the 14 primer pairs were arranged in descending order of non-paternal exclusion rate, and then accumulated one by one: when one parent is known, the cumulative exclusion rate of 3 loci can reach more than 99%, that is, for any One offspring can exclude 99 non-biological fathers from 100 random fathers; when the number of loci is increased to 6, the cumulative exclusion rate can reach 99.99%. When both parents are unknown, 8 primers are needed. The combination can reach a non-parent exclusion rate of 99.99%.

The exclusion probability and the cumulative exclusion probability are shown in Table 5.

In order to make the identification results more accurate, this experiment selected 8 microsatellite site combinations for the paternity test of Chongming goats. They are LSCV043, BMS1724, BM6526, Oarfb48, BMS1248, BMS1678, BMS574, BMS875.

[0104]

Table 5 14 microsatellite sites' patriarchal exclusion rate and cumulative exclusion rate

[0107]

Example 2. Verification of the microsatellite detection system

[0108]

Theoretically speaking, as long as the genotype of a genetic marker does not conform to Mendelian law of inheritance, a conclusion can be made that excludes patriarchy.

However, by detecting DNA polymorphisms to identify paternity relationships, there is the possibility of false exclusion. In order to prevent wrong conclusions, the present invention follows the following principles in the exclusion of paternity: There are 3 or more microsatellite markers that do not meet Mendelian standards. The law of inheritance makes a conclusion that excludes the parent-child relationship.

[0109]

From the experimental Chongming Goat parent-child group, 13 father-daughter parent-child pairs and 1 unrelated father were selected.

Assuming that these 4 rams (numbered 11♂-14♂, see Table 6) are the hypothetical fathers of these 13 ewes, the genotype results of 8 microsatellite markers selected by the above experiment were used to simulate paternity testing, and a sample of 10,000 Second, the PCR reaction system and reaction conditions are the same as the above experiment.

According to the distribution of the genotypes of the selected 8 microsatellite markers in the parents and offspring, a paternity test was carried out.

Apply Ceruvs3.

O software (<http://www.fieldgenetics.com/pages/login.jsp>) calculates the parent-child relationship of the detected individual, and the calculation method of the paternity probability is as follows:

[0110]

According to the detected phenotype, list the possible genotypes of the mother, child, and hypothetical father.

According to the combination of mother and child, the mother's genotype (biological mother's gene) and the genotype (biological father's gene) must be determined from the biological father.

Calculate the probability of the suspected father being the biological father of the child:

[0111]

$$X=f\times c$$

[0112]

In the formula, f is the probability of the biological mother's gene (when there is only one biological mother's gene, the gene is 100% inherited to the offspring, so the probability of the biological mother's gene is 1 at this time), and c is the probability that the suspected father provides the biological father's gene.

[0113]

Calculate the probability of a random individual in the population becoming the father of a child:

[0114]

$$Y=2f\times g$$

[0115]

In the formula, g is the gene frequency of the biological father in the population.

[0116]

Calculate PI (patriarchal index) according to $PI=X/Y$. At all detected sites, each site can calculate a PI value, and the cumulative PI value of multiple sites is equal to the product of the PI values of each site, But the prerequisite is that there is no genetic linkage between the detected points.

[0117]

The PI value calculated above is an absolute value. In order for the identification result to express the relative chance of paternity (RCP) of the parent-child relationship in the form of probability, the PI value must be converted into a relative value RCP.

After calculating the PI value, $RCP=[PI/(PI+1)]\times 100\%$.

According to the practice of paternity testing at home and abroad, when the RCP value is greater than 99.73%, it can be assumed that the father and the child have a biological relationship.

If the RCP value is less than 99.73%, it can be considered that the parent and child do not have a biological relationship.

If the RCP value is less than 99.73%, the number of detection sites should be increased until the RCP is greater than 99.73%.

[0118]

Table 613 single parent identification results of offspring

[0120]

* Indicates that the reliability is more than 99% when Delta is greater than 0.25.

[0121]

The results of the single parent identification of the 13 children mentioned above are shown in Table 6, where the LOD value is the logarithmic value of the paternity index. The meaning of LOD greater than 0 is that compared with any individual, the candidate parent (Candidate Parent) is most likely to be true. The parental generation of; LOD value less than 0 means that compared with any individual, the candidate parent is unlikely to be the real parent.

Most likely parent is the individual with the highest LOD value.

Delta is a statistic used to evaluate the credibility of the identification results. When the individual LOD value is greater than 0, Delta is defined as the LOD value itself. According to the simulation results, when Delta is greater than 0.25, the credibility reaches 99%; When Delta is greater than 0, the reliability reaches 95%.

The relative chance of patriarchy (RCP) is a function of the parent-child index, which indicates the chance that the suspected father is the real father.

[0122]

The test results show that ET-62, ET-56, and ET-56 are descendants of 11♂; ET-58, ET-60, ET-57, ET-64, ET-66, and ET-68 are descendants of 13♂; ET- 48. ET-49, ET-50, and ET-52 are the offspring of 14♂; 12♂ is an unrelated individual. The test result is consistent with the pedigree record, and the probability of random exclusion of each offspring against the parent is greater than 0.9998. The result is The reliability is up to 99%; except for ET-52 and ET-49, the RCP values of the candidate parents of the other individuals are all greater than 99.99%.

The above analysis results confirmed that the 8 microsatellite markers selected above are feasible for paternity testing of Chongming goats.

[0123]

Example 3.

Chong understands goat paternity test kit and its composition

[0124]

The above test results show that the application of 8 microsatellite markers LSCV043, BMS 1724, BM6526, Ofarfb48, BMS1248, BMS1678, BMS574, BMS875 can be used for paternity testing of Chongming goats, and the probability of exclusion of real parents and suspected parents can be greater than 99.9%. The relative patriarchal chance is greater than 0.99, and the appraisal result is more credible.

Therefore, these 8 microsatellite primer combinations were used to make a kit for paternity testing of Chongsheng goats.

[0125]

The kit includes the following reagents:

[0126]

(1)Taq DNA polymerase 2.5U/ul

[0127]

(2)10×PCR Buffer (Mg2+Free) buffer

[0128]

(3)dNTPs25mmol/L

[0129]

(4)MgCl₂ solution 25mmol/L

[0130]

(5)The 8 microsatellite markers selected in the above experiment: LSCV043, BMS1724, BM6526, Oarfb48, BMS1248, BMS1678, BMS574, BMS875 were used as special primers for paternity testing of Chongming goats.

[0131]

(6)ddH₂O

[0132]

The specification of the kit is 20 times/box, the amount of each component in each box is one bottle of Taq DNA polymerase (400ul/bottle), one bottle of 10×PCRBUFFER (Mg²⁺+Free) buffer (400ul/bottle), dNTPs One bottle (200ul/bottle), one bottle of MgCl₂ solution (200ul/bottle), one bottle (50ul/bottle) and one bottle of ddH₂O (1000ul/bottle) for the upstream and downstream primers of each pair of primers.

The components in the kit are divided into the above-mentioned dosages, and the Chongming Goat Paternity Test Kit is obtained after packaging.

[0133]

The foregoing description of the embodiments is for the convenience of those skilled in the art to understand and apply the present invention.

It is obvious that those skilled in the art can easily make various modifications to these embodiments, and apply the general principles described here to other embodiments without creative work.

Therefore, the present invention is not limited to the embodiments herein. According to the disclosure of the present invention by those skilled in the art, all improvements and modifications made without departing from the scope of the present invention should fall within the protection scope of the present invention.

KELLY CRISTINA ELEUTÉRIO LEITE

Análise da Estrutura Genética e Biologia Reprodutiva do Papagaio-Verdadeiro (*Amazona aestiva*)

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

Orientadora: Dra. Rosane Garcia Collevatti

Co-orientador: Dr. Renato Caparroz

Brasília - DF

2007

*A minha família pelo apoio incondicional e aos amigos
Rosane e Renato pela imensa e válida contribuição na
minha formação profissional.*

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais **Solon e Geralda** e irmãos **Anne e Solon Filho** que nunca mediram esforços para que eu realizasse os meus sonhos e insistem sempre em me apoiar e me incentivar. Pelo incondicional amor que me fortalece cada vez mais e me torna a cada dia uma pessoa mais realizada.
- A minha orientadora e amiga **Dra. Rosane Garcia Collevatti** por ter me oferecido muitas oportunidades contribuindo intensamente na minha formação pessoal e profissional. Pelas intermináveis horas de atenção e disponibilidade em ensinar e aconselhar em todos os momentos. Pela sabedoria e seriedade que conduziu a orientação deste trabalho e pela confiança depositada em mim. Sinto-me honrada por aprender com seus ensinamentos.
- Ao meu co-orientador e amigo **Dr. Renato Caparroz** pelas horas de dedicação e imensurável contribuição nesse trabalho. Pelos preciosos ensinamentos e conselhos e por sempre se mostrar disponível e paciente para mostrar os caminhos para o melhor desenvolvimento deste trabalho. Tenha consigo minha imensa admiração.
- As amigas **Roberta Nancy e Luciana Bezerra** pela amizade, lealdade e cumplicidade, e por sempre me oferecer muito apoio e incentivo compartilhando momentos de dificuldade e de felicidade.
- As amigas **Jackeline Leite, Karoline Silva, Andréia Souza, Elizabeth Cândido, Ana Borges e Aline Castro** pelas longas horas de estudo e diversão.
- As amigas **Aline Braga e Alessandra Reis** pela ajuda sempre disponível no laboratório, e por todos os momentos de aprendizado e de boas risadas.
- Aos **demais amigos e familiares** por sempre, presentes ou não, estarem torcendo por mim e pelo êxito na conclusão deste trabalho.
- Ao **Dr. Rinaldo Pereira** pelos ensinamentos e pela ajuda cedida nos momentos solicitados, e por ter aceitado participar da banca examinadora na qualificação e na defesa dessa dissertação.
- Ao **Dr. Ruy Caldas**, coordenador do curso de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, pelo incentivo sempre oferecido em palavras de encorajamento e pela exemplar coordenação deste curso.

- A **Danielle de Moura** e ao secretário **Fábio Costa** pela ajuda e atenção sempre disponíveis.
- Aos técnicos **André Ramos, Idacuy** e **Willian Baião** pela ajuda sempre prestativa no laboratório que foi de grande contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.
- A **Universidade Católica de Brasília** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro que tornou possível a realização desse trabalho.
- A **SEMARH** que autorizou a realização das coletas na Estação Ecológica de Águas Emendadas e ao funcionário **Gilvan** que auxiliou nesse processo.
- Aos **funcionários do Jardim Botânico e da Estação Ecológica do IBGE** que permitiram a realização das coletas nessas áreas.

RESUMO

Informações sobre a biologia, ecologia e variabilidade genética de uma espécie são fundamentais para subsidiar a elaboração de estratégias de conservação de suas populações naturais. O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) possui ampla distribuição geográfica e ainda é abundante em algumas áreas de ocorrência, por isso não é considerado ameaçado de extinção. No entanto, é um dos psitacídeos neotropicais mais capturado na natureza para abastecer o comércio ilegal de animais silvestres. O objetivo deste trabalho é analisar a estrutura genética de cinco populações naturais de *A. aestiva* e verificar se estas apresentam efeito de gargalo genético (*genetic bottleneck*), bem como analisar a biologia reprodutiva desta espécie quanto aos aspectos da monogamia e da fidelidade ao ninho. Neste trabalho, foi testada a transferibilidade de 12 pares de iniciadores para amplificação de locos microssatélite desenvolvidos para *A. guildingui* e cinco desenvolvidos para *Ara ararauna*. Dos 17 pares de iniciadores, 14 apresentaram produtos de amplificação, sendo nove destes polimórficos (com cinco alelos ou mais por loco). A estrutura genética das cinco populações de *A. aestiva* foi averiguada com base na análise de seis pares de locos microssatélite em uma amostra de 74 indivíduos, incluindo amostras das duas subespécies de *A. aestiva* atualmente reconhecidas (*A. a. aestiva* e *A. a. xanthopteryx*). Foi encontrada uma baixa estruturação genética entre as populações dos extremos da distribuição geográfica ($\theta = 0,012$; $p = 0,0007$) e a análise de efeito de gargalo genético não indicou redução recente no tamanho para nenhuma população. A análise da biologia reprodutiva foi baseada em testes de parentesco entre ninhinhos do mesmo ninho (para verificar a hipótese de monogamia) e entre ninhadas coletadas no mesmo ninho em estações reprodutivas diferentes (para testar a hipótese de fidelidade ao ninho). O estudo de parentesco baseado em 44 ninhadas forneceu evidências que corroboram a hipótese de monogamia da espécie. A análise de fidelidade ao ninho foi significativa para três dos sete ninhos analisados. Os resultados genéticos obtidos nesse trabalho poderão auxiliar na compreensão da atual situação taxonômica de *A. aestiva* e dos processos envolvidos na evolução desta espécie, além de contribuir com informações importantes sobre as populações naturais e sobre o comportamento reprodutivo do papagaio-verdadeiro, proporcionando maior subsídio para a elaboração de futuros programas de conservação.

Palavras-chave: *Amazona aestiva*, microssatélites, estrutura genética, comportamento reprodutivo, monogamia, parentesco.

ABSTRACT

Information on biology, ecology and genetic variability of a specie are ultimate to subsidize the elaboration of strategies of conservation of its natural populations. The blue-fronted amazon (*Amazona aestiva*) presents a widespread distribution and is still abundant in some areas of occurrence, therefore it is not under threat of extinction. However, it is one of the most neotropical parrots captured in the nature to supply the illegal trade of wild animals. The goals of this study is to analyze the genetic structure of five *A. aestiva* populations and verify if there are effects of bottleneck in population size, and moreover analyze the reproductive biology under aspects of monogamy and nest fidelity. In this study, we tested the transferability of the 12 microsatellite primers developed for *A. guildingui* and five for *Ara ararauna*. From the 17 markers, 14 presented amplification products, of which nine were polymorphic (with five or more alleles per locus). The genetic structure of five *A. aestiva* populations was investigated by analyzing six microsatellite loci in 74 samples, including samples from two subspecies recognized (*A. a. aestiva* e *A. a. xanthopteryx*). There was a low evidence of genetic structure between the populations of the limits of the geographic distribution ($\theta = 0,012$; $p = 0,0007$) and the bottleneck analysis did not show recent reduction on population size. The analysis of reproductive biology was based on parentage tests among nestlings from the same nest (to verify the monogamy hypothesis) and among clutches collected in the same nest in different breeding seasons (to verify the nest fidelity hypothesis). The parentage assignment performed in 44 clutches yields evidences that corroborate with the monogamy hypothesis. Three out of seven analysis of nest fidelity was significant. The results obtained on this study must enlighten the taxonomic situation of *A. aestiva* and the evolution processes involving this species. Furthermore, contribute to important information on the natural populations and the reproductive behavior of the blue-fronted amazon, providing subsidy for the elaboration of future programs of conservation.

Keywords: *Amazona aestiva*, microsatellites, genetic structure, reproductive behavior, monogamy, parentage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vórtices da extinção	13
Figura 2	Modelos de estrutura populacional	18
Figura 3	Distribuição geográfica de <i>Amazona aestiva</i> e das duas subespécies atualmente reconhecidas (<i>A. a. aestiva</i> e <i>A. a. xanthopteryx</i>)	26
Figura 4	Locais de obtenção das amostras de <i>A. aestiva</i> .	32
Figura 5	Distribuição em classes das frequências alélicas para as cinco populações estudadas de <i>A. aestiva</i> segundo o programa <i>Bottleneck</i> .	46
Figura 6	Valores dos índices de relação genética (r) entre pares de indivíduos obtidos por 1.000 simulações utilizando as frequências alélicas estimadas para 115 amostras de <i>A. aestiva</i> e seis pares de locos microssatélite segundo o programa <i>Kinship 2.1</i> .	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Locais de obtenção das amostras de <i>Amazona aestiva</i>	31
Tabela 2	Características de 18 pares de locos microssatélite desenvolvidos para as espécies <i>A. guildingui</i> e <i>Ara ararauna</i> , testados em 22 indivíduos de <i>A. aestiva</i>	41
Tabela 3	Caracterização de nove pares de locos microssatélite desenvolvidos para as espécies <i>A. guildingui</i> e <i>Ara ararauna</i> , testados em 22 indivíduos de <i>A. aestiva</i> .	43
Tabela 4	Caracterização das cinco populações de <i>A. aestiva</i> baseadas em seis pares de locos microssatélite.	44
Tabela 5	Estrutura genética de cinco populações de <i>A. aestiva</i> baseada na análise da variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para seis pares de locos microssatélite (R_{ST}).	44
Tabela 6	Valores de <i>theta</i> par a par para cinco populações de <i>A. aestiva</i> baseada na análise de seis pares de locos microssatélite	45
Tabela 7	Resultados da análise de filhotes de <i>A. aestiva</i> encontrados no mesmo ninho em diferentes localidades: razões de probabilidades (LOD) e estimativa das relações genéticas (r) obtidas pela análise de seis pares de locos microssatélite.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	MicroMolar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ESU	<i>Evolutionary Significant Unit</i> (Unidade evolutivamente significativa)
g	Grama
kb	Kilobase
M	Molar
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	MiliMolar
MU	<i>Management Unit</i> (Unidade de Manejo)
NaCL	Cloreto de sódio
pb	Pares de Base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PVA	Análise da viabilidade populacional
STR	<i>Short tandem repeat</i> (microsatélite)
SMM	<i>Stepwise Mutation Model</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TPM	<i>Two-Phase Mutation Model</i>
U	Unidade

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1 Genética da Conservação	12
1.2 Estrutura Populacional e Conservação	16
1.3 O estabelecimento de ESUs e MUs	19
1.4 Os microssatélites	21
1.5 A espécie <i>Amazona aestiva</i> (Papagaio-verdadeiro)	25

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
2.3 Hipóteses de trabalho	30

3. Material e Métodos

3.1 Caracterização das amostras e extração de DNA	31
3.2 Transferibilidade e caracterização dos locos microssatélite	33
3.3 Estrutura genética	35
3.3.1 Seleção da amostra	35
3.3.2 Análise genética	36
3.4 Gargalo genético	37
3.5 Parentesco e fidelidade ao ninho	38
3.5.1 Seleção da amostra	38
3.5.2 Análise genética	38

4. Resultados

4.1 Transferibilidade e caracterização dos locos microssatélite	41
4.2 Estrutura Genética	43
4.3 Gargalo genético	45
4.4 Parentesco e fidelidade ao ninho	46

5. Discussão

5.1 Transferibilidade e caracterização dos locos microssatélite	50
5.2 Estrutura Genética	52
5.3 Gargalo genético	54
5.4 Parentesco e fidelidade ao ninho	56
5.5 Implicações para a conservação	58

6. Conclusões	62
----------------------	----

8. Referências	63
-----------------------	----

9. Anexos

- 9.1** Characterization of microsatellite *loci* in three species of *Amazona* (Psittaciformes: Aves) using heterologous primers
- 9.2** Distribuição das frequências alélicas para cada loco microssatélite e para cada população.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Genética da Conservação

A ciência da Biologia da Conservação, iniciada na década de 80 (SOULÉ E WILCÓX, 1980; SOULÉ 1986, 1987) proporciona a identificação das causas e conseqüências referentes aos processos de extinção e evolução de uma população ou espécie, permitindo a elaboração e aplicação de estratégias de conservação que sejam efetivas na redução ou eliminação dos riscos de extinção (TERBORGH E WINTER, 1980; SOULÉ, 1986; FRANKHAM et al., 2002).

Desde os estudos iniciais nessa área do conhecimento, a perda de diversidade genética é considerada um dos principais fatores atribuídos ao aumento dos riscos de extinção (ALLENDORF E LEARY, 1986; SOULÉ 1986, 1987). Como as populações pequenas tendem a apresentar baixa variabilidade genética, os processos de extinção e evolução nessas populações formaram as bases iniciais do desenvolvimento teórico da Genética da Conservação, campo intimamente relacionado com a Biologia da Conservação (FRANKLIN, 1980; SOULÉ, 1987; FRANKHAM, 1995; FRANKHAM et al., 2002a).

Os primeiros estudos foram direcionados à determinação do tamanho mínimo de uma população para que esta fosse mantida viável em longo prazo, termo conhecido como MVP (*minimum viable population*) (GILPIN, 1987). Porém, somente a estimativa do tamanho efetivo populacional de uma espécie não é suficiente para inferir os riscos de extinção (GILPIN E SOULÉ, 1986). Como cada espécie apresenta uma história de vida particular (por exemplo, distribuição temporal e espacial, nível de variação genética), este tamanho deve ser associado a fatores biológicos, ecológicos, demográficos e genéticos, associados aos seus respectivos elementos estocásticos, para que as ameaças de extinção acentuadas em pequenas populações sejam devidamente caracterizadas (GILPIN E SOULÉ, 1986).

A partir dessa associação GILPIN E SOULÉ (1986) desenvolveram um processo de análise de viabilidade (ou vulnerabilidade) populacional, conhecido como PVA (*population viability analysis*). Pela avaliação desse processo, foi possível a identificação dos chamados “vórtices da extinção”, os quais auxiliam na identificação e compreensão dos eventos envolvidos no processo de extinção de uma espécie (GILPIN E SOULÉ, 1986).

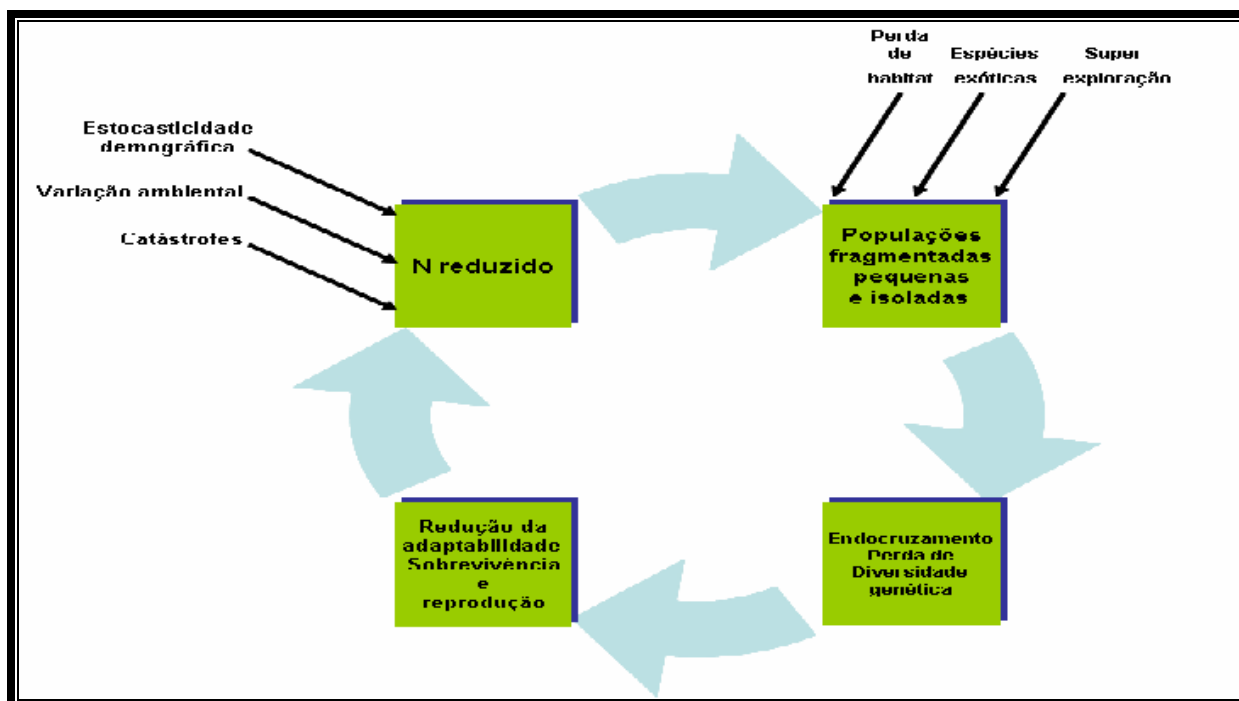


Figura 1: Os vórtices da extinção proposto por Gilpin e Soulé (1986)
Adaptado: Frankham, 2002.

Segundo GILPIN E SOULÉ (1986), o processo de extinção é iniciado pela redução do tamanho populacional. Essa redução pode ser induzida por vários fatores como a perda de habitat (RUSSELLO et al., 2004; FUNK et al., 2005; JUMP et al., 2006), a superexploração de uma determinada espécie (BAUM et al., 2003; PERES et al., 2003), ou a introdução de espécies exóticas (COBLENTZ, 1990; BOUZAT et al., 1998; CASSEY et al., 2005); ou pode ser provocada por fatores estocásticos demográficos ou ambientais (ELDRIDGE et al., 1999; STENSETH et al., 1999). Pequenas populações também podem ser originadas pelo deslocamento de poucos indivíduos de uma determinada área que passam a ocupar uma nova região, evento conhecido como efeito fundador (CLEGG et al., 2001; HEDRICK et al., 2001; GRANT, 2002). Quando a redução do tamanho populacional ocorre de maneira repentina e intensa, é dito que tal população sofreu um evento conhecido como efeito de gargalo genético (*genetic bottleneck*) e muitas vezes a recuperação de um tamanho viável por meio de planos de manejo populacional, nos quais os riscos de extinção são reduzidos ou eliminados, pode ser uma tarefa extremamente difícil e demorada. (TEMPLE, 1986; GLENN et al., 1999; BAUM et al., 2003).

A redução no tamanho populacional pode alterar a distribuição espacial de uma população, originando populações fragmentadas, pequenas e isoladas, introduzindo ou aumentando o processo

de subdivisão populacional (GILPIN E SOULÉ, 1986). Esse isolamento é responsável pelo aumento dos riscos de extinção por duas razões: as populações pequenas podem ser completamente eliminadas por flutuações demográficas ou ambientais, ou por catástrofes naturais (fatores estocásticos); ou podem apresentar declínio da diversidade genética devido à ocorrência de processos como endocruzamento e deriva genética, tornando-se mais vulneráveis a extinção (FRANKLIN, 1980; GILPIN E SOULÉ, 1986; TERBORGH E WINTER, 1987; FRANKHAM, 1995; FRANKHAM et al., 2002a).

O endocruzamento é interpretado como a alta frequência de acasalamentos entre indivíduos aparentados, e quando se trata de pequenas populações, esse processo é acentuado de tal maneira que em poucas gerações é inevitável que todos os indivíduos sejam aparentados (FRANKHAM et al., 2002b). A alta frequência de acasalamentos entre indivíduos geneticamente relacionados proporciona o declínio da variabilidade genética pelo decréscimo da frequência de heterozigotos e pelo aumento da probabilidade dos alelos deletérios ocorrerem em homozigose (SOULÉ E WILCÓX, 1980a; RALLS et al., 1986; FRANKHAM, 1995). Como a alta frequência de heterozigotos está associada a altas taxas de sobrevivência, crescimento, resistência a doenças e reprodução em muitas espécies (ALLENDORF E LEARY, 1986), a baixa frequência desses genótipos pode ser diretamente relacionada com a baixa adaptabilidade da população. A baixa adaptabilidade decorrente da expressão de alelos deletérios em uma população é chamada de depressão endogâmica e em muitos casos pode-se verificar que esse processo torna as populações mais susceptíveis ao processo de extinção (FRANKLIN, 1980; FRANKHAM, 1995; BOUZAT et al., 1998; SACCHERI et al., 1998).

Porém, não é somente o acasalamento entre indivíduos aparentados que proporciona o declínio da variabilidade genética e da adaptabilidade em populações pequenas. Mesmo que ocorra acasalamento entre indivíduos não relacionados geneticamente, a variabilidade genética pode ser reduzida devido ao processo chamado deriva genética, dado pela mudança aleatória das frequências alélicas de uma geração para outra, induzindo a fixação de determinados alelos, e consequentemente, a perda de outros (FRANKLIN, 1980; HEDRICK E KALINOWSKI, 2000; FRANKHAM et al., 2002a; GAUTSCHI et al., 2003). O processo de deriva genética é mais pronunciado em populações que sofreram efeito de gargalo genético (GLENN et al., 1999) ou efeito fundador (CLEGG et al., 2001; HEDRICK et al., 2001), e pode ser diretamente relacionado à baixa adaptabilidade destas populações (HEDRICK E KALINOWSKI, 2000). Por exemplo, os

indivíduos derivados das populações que sofreram estes eventos, podem, ao acaso, carregar uma frequência menor dos genótipos favoráveis (adaptados) em relação à frequência destes nas populações anteriores (HEDRICK E KALINOWSKI, 2000).

O processo de análise da viabilidade populacional (PVA) (GILPIN E SOULÉ 1986) funciona como uma ferramenta indispensável nos estudos de conservação para o estabelecimento de estratégias de recuperação de populações naturais. Estudos sobre fatores como redução no tamanho populacional, perda da diversidade genética e declínio da adaptabilidade, sobrevivência e reprodução de populações naturais permitem a elaboração de planos de manejo *in situ* e *ex situ* que sejam efetivamente direcionados para a redução ou eliminação dos riscos de extinção de populações e espécies.

1.2 Estrutura Populacional e Conservação

Na determinação da PVA de uma espécie, a estrutura espacial dos indivíduos, principalmente no que tange a formação de pequenas populações, apresenta um papel importante na dinâmica que envolve os vórtices da extinção (GILPIN, 1987). A principal consequência de uma população que se apresenta de forma fragmentada no espaço é a limitação do fluxo gênico que ocorre entre indivíduos de grupos populacionais distintos, o que pode gerar pequenos grupos isolados, e conseqüentemente, uma diferenciação genética entre estes (BLEICH et al., 1990; COLLEVATTI et al., 2001; ZUCCHI et al., 2003; DALEN et al., 2006).

Em longo prazo, a principal consequência deste isolamento reprodutivo é a formação de populações localmente adaptadas, ou seja, populações que apresentam um conjunto de alelos favorecido pelas condições locais, e pode, portanto, favorecer o processo de especiação (WRIGHT, 1978). Por outro lado, a manutenção do fluxo gênico gera uma maior variabilidade genética permitindo uma menor diferenciação entre as populações e proporcionando maior potencial evolutivo para estas (BALLOUX E LUGON-MOULIN, 2002). Desse modo, é fundamental compreender como ocorre o fluxo gênico entre os indivíduos e os efeitos deste em estudos de estrutura genética de populações. Do ponto de vista da conservação, a estimativa da diferenciação genética entre as populações faz-se necessário, uma vez que a identificação de populações isoladas ou contínuas poderá direcionar corretamente as estratégias de manejo para uma determinada espécie.

Em estudos de populações naturais, a identificação da estrutura genética pode ser realizada a partir da utilização dos coeficientes de endocruzamento descritos por SEWALL WRIGHT (1951) F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} . Esses coeficientes são baseados nos níveis de heterozigisidade presentes nos três níveis hierárquicos de uma estrutura populacional: o indivíduo, a subpopulação e a população total. Posteriormente, COCKERHAM (1969) descreveu medidas de diferenciação genética análogas aos coeficientes de S. WRIGHT (f , θ , F_s), baseadas na análise de variância das frequências alélicas.

Populações estruturadas em subgrupos podem ser identificadas na maioria das espécies, onde os indivíduos são organizados em “manchas populacionais” (GILPIN, 1987; HARTL E CLARCK, 1997; FRANKHAM et al., 2002b). Essa estruturação interfere diretamente no modo como ocorre o fluxo gênico entre os indivíduos. Por essa razão, alguns modelos foram propostos para explicar como a variabilidade genética é distribuída dentro e entre as populações (Figura 2).

No modelo de ilhas todas as subpopulações apresentam o mesmo tamanho e o fluxo gênico entre estas é independente da proximidade geográfica, ou seja a taxa de migração é a mesma em qualquer direção (WRIGHT, 1942). Segundo o modelo isolamento por distância a distribuição dos indivíduos é contínua no espaço, porém o fluxo gênico é restrito a curtas distâncias permitindo a formação de “vizinhanças genéticas” (WRIGHT, 1942; 1951). No modelo *stepping-stone* o fluxo gênico ocorre entre subpopulações adjacentes que são distribuídas em dimensões limitadas espacialmente (KIMURA E WEISS, 1964).

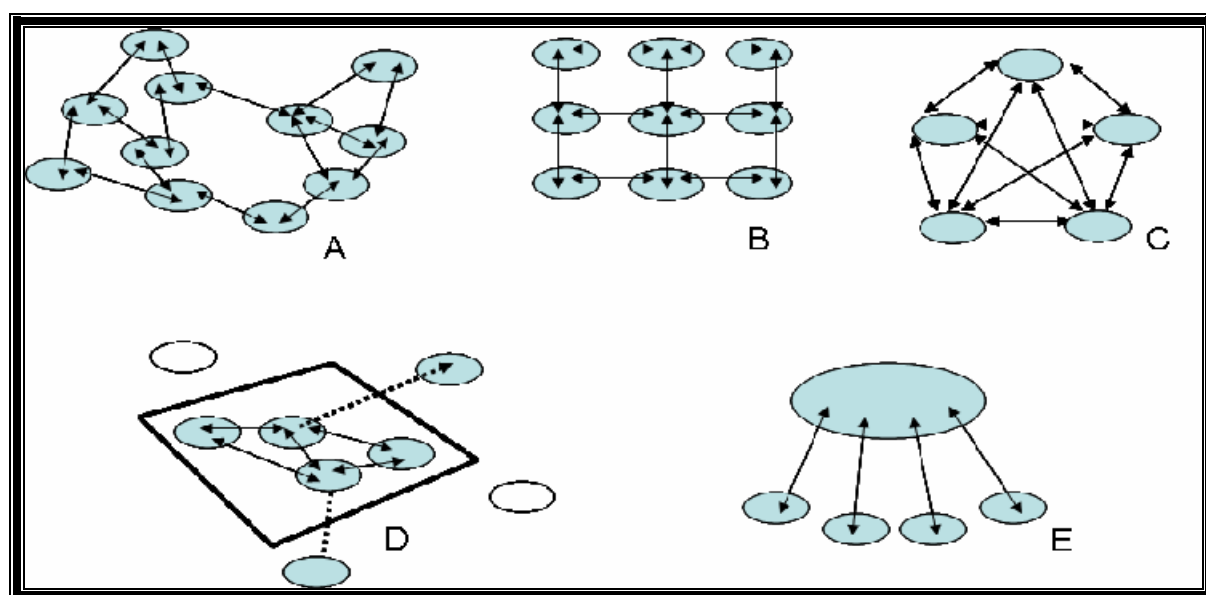


Figura 2: cinco diferentes modelos de estrutura de população: A) isolamento por distância; B) *stepping-stone*; C) modelo de ilhas; D) metapopulação; E) *source-sink*. (Adaptado: Frankham, 2002).

Estudos baseados no modo como ocorre o fluxo gênico e como este interfere na estrutura de uma população auxiliam na inferência de fatores associados à distribuição da variabilidade genética, e conseqüentemente, são de grande importância na definição de estratégias de conservação (PAETKAU et al., 1999, SHERWIN et al., 2000; COLLEVATTI et al., 2001; EIZIRIK et al., 2001). Por exemplo, caso as populações não sejam diferenciadas geneticamente, seria viável concentrar esforços em apenas uma área, utilizando indivíduos desta para eventual recolonização de outras regiões (HAIG, 1998). Porém, populações isoladas geograficamente, com baixa ou nenhuma ocorrência de fluxo gênico, podem ao longo das gerações apresentarem composição genética completamente diferente, o que direciona as propostas de conservação para cada área isoladamente.

1.3 O estabelecimento de ESUs e MUs

Nas três últimas décadas, a identificação de diferenciação genética entre populações tem sido indispensável para a elaboração de propostas de conservação. Em meados da década de 80, foi proposto o conceito de Unidade Evolutivamente Significativa – ESU (*Evolutionary Significant Unit*) (RYDER, 1986), definida como grupos de indivíduos isolados por um período de tempo suficiente para que estes apresentem alta diversidade genética entre si. Como essa definição apresenta limites para atender as propostas de conservação, uma vez que o estabelecimento de ESUs deve ser associado com diferentes tipos de informação (ecológicas, fisiológicas e outras) (RYDER, 1986; PAETKAU, 1999; FRASER et al., 2001), esse conceito tem sido amplamente reformulado (CRANDALL et al., 2000; FRASER et al., 2001).

No início dos anos 90, surgiram mais duas definições para ESUs. Uma dessas propõe que ESUs sejam populações isoladas reprodutivamente apresentando diferenciação adaptativa, o que representa um importante componente na evolução de espécies (WAPLES, 1995) Quanto a determinação da estrutura populacional, a aplicação dessa definição não seria difícil, uma vez que esse fator pode ser detectado por métodos moleculares (FRASER et al., 2001). O limite dessa aplicação está na representatividade da diferenciação adaptativa, uma vez que esta pode ser decorrente de adaptação local mesmo quando existe fluxo gênico (CRANDALL et al., 2000). Outra definição seria dada por populações nas quais as linhagens do DNA mitocondrial (DNAm) são reciprocamente monofiléticas, ou seja, todas as linhagens dentro de uma subpopulação

compartilham um ancestral comum mais recente do que o compartilhado por linhagens de grupos distintos (MORITZ, 1994).

As ESUs podem também ser classificadas como populações que apresentam baixo fluxo gênico entre si e que estão sofrendo efeitos de forças evolutivas como deriva genética e seleção (CRANDALL et al., 2000). Essa proposta é uma das mais recomendadas para atender ao estabelecimento de ESUs por duas razões: aborda a existência de diferenciação adaptativa entre populações baseada em modificações genéticas e ecológicas; e as possibilidades histórica ou recente de ocorrência do fluxo gênico (CRANDALL et al., 2000; FRANKHAM et al., 2002b).

A diferenciação genética entre populações também serviu de base na proposta de um conceito menos específico que o de ESU. MORITZ (1994) propôs o conceito de Unidade de Manejo (*Management Unit* - MU) baseado nas diferenças das frequências alélicas entre subpopulações. Porém esse conceito apresenta uma limitação importante: a detecção de estrutura populacional é dependente da variabilidade e do número de marcadores moleculares, bem como do tamanho amostral, o que nem sempre é possível para muitos estudos de populações naturais (PAETKAU, 1999).

Independente do conceito de ESU ou de MU, a decisão de conservar uma espécie deve ser tomada cuidadosamente. Os resultados obtidos por análise genética não devem ser considerados isoladamente para o estabelecimento de MUs, e sim associados a dados ecológicos e históricos, o que é fundamental para que as estratégias de conservação sejam efetivas (SHERWIN et al., 2000). Além disso, como cada população ou espécie apresenta características particulares, como por exemplo, nível de fluxo gênico, distribuição e história de vida, os objetivos associados à conservação devem ser atenciosamente instituídos, e ainda, os riscos de extinção devem ser identificados e considerados para que finalmente possam ser definidas tais unidades (TAYLOR et al., 1999).

1.4 Os microsatélites

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas moleculares têm permitido a identificação e o acesso a diferentes tipos de marcadores moleculares, auxiliando no desenvolvimento de muitos princípios teóricos e práticos aplicados na Genética da Conservação. Segundo AVISE (1994), os marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer loco

gênico, ou seu produto, que apresenta variabilidade que permita estudar um problema biológico. Nas últimas décadas, os marcadores moleculares do tipo microssatélite ou STR (*Short Tandem Repeats*) têm atraído a atenção dos pesquisadores pelo seu potencial de aplicação em diversas áreas do conhecimento (GOLDSTEIN E SCHLÖTTERER, 1999), inclusive sendo amplamente utilizado em estudos populacionais auxiliando extensivamente na compreensão e resolução de diversos problemas biológicos.

Os microssatélites são unidades de seqüências repetidas lado a lado que podem variar de 1 a 6 pb (TAUTZ, 1989, LITT E LUTY, 1989). São marcadores altamente polimórficos e a variação entre os alelos é atribuída ao número de repetições lado a lado para determinado loco (TAUTZ, 1989, LITT E LUTY, 1989). Acredita-se que o número de unidades repetitivas sofra alguma forma de restrição, e a principal evidência é a ausência de microssatélites muito longos (alelos com mais de 60 repetições são raramente observados) (GOLDSTEIN et al., 1997). Evolutivamente, a seleção natural é considerada o processo mais importante para a manutenção de tamanhos restritos dos marcadores microssatélite (LI et al., 2002), ou seja, algumas seqüências particulares podem sofrer forte pressão de seleção contra a ocorrência de repetições (TÓTH et al., 2000). Essa manutenção também explica porque deleções são mais comuns do que adições em alelos maiores, e porque deleções geralmente envolvem mais do que uma unidade de repetição (PRIMMER E ELLEGREN, 1998).

Além de polimórficos, os microssatélites apresentam outras características que os tornam uma ferramenta altamente informativa para diversos tipos de estudo: apresentam herança codominante (RAFALSKI et al., 1996), o que permite diferenciar indivíduos homozigotos de indivíduos heterozigotos, e apresentarem alta taxa de mutação, cerca de 10^{-4} , quando comparada à taxa estimada de mutação pontual, cerca de 10^{-10} (HANCOCK, 1999).

O modelo que explica a maioria das mutações nos marcadores microssatélite é o *Stepwise Mutation Model* (SMM) (OHTA E KIMURA, 1973), para o qual é assumido que uma mudança no estado alélico ocorre pela perda ou ganho de uma unidade de repetição. Porém, é importante ressaltar que mutações em maiores escalas também ocorrem, porém com menos freqüência (VALDES et al., 1993; GOLDSTEIN et al. 1997). Outros dois modelos propõem explicações para tais eventos de mutação: o modelo de alelos infinitos (KIMURA E CROW, 1964) e o *Two-phase mutation model* (TPM) (DI RIENZO et al., 1994). O modelo de alelos infinitos considera uma situação extrema na qual o número possível de estados alélicos em um determinado loco pode ser

extremamente grande, no qual cada novo alelo mutante é um novo estado alélico não existente anteriormente em uma população. Já o *Two-phase mutation model* propõe que a instabilidade dos alelos é devida principalmente ao aumento ou diminuição de uma unidade repetitiva, com probabilidade igual a p , mas que mutações envolvendo mais de uma unidade repetitiva também podem ocorrer, com probabilidade igual a $1-p$.

Em estudos populacionais é essencial saber qual modelo de mutação deve ser aplicado, uma vez que os parâmetros populacionais, tais como diferenciação genética e número de migrantes são dependentes do modelo de mutação assumido para os marcadores microssatélite utilizados (ESTOUP E CORNUET, 1999).

Estudos relacionados à distribuição dos microssatélites em diversos genomas têm sido amplamente realizados, mostrando que estes marcadores não ocorrem de forma aleatória ao longo do genoma. Em genomas de plantas, motivos com repetição de três bases, são encontrados com maior frequência em regiões transcritas do que em regiões não transcritas do DNA (MORGANTE et al., 2002). Em humanos, estes motivos de trinucleotídeos são responsáveis por doenças neurodegenerativas e são mais comuns em regiões gênicas, enquanto que nas regiões não gênicas estão presentes em maiores proporções os motivos dinucleotídeos e tetranucleotídeos (GOLDSTEIN et al., 1997). Os motivos hexanucleotídeos constituem o segundo grupo de motivos mais frequentes em éxons de diversos táxons, e em invertebrados são mais frequentes do que os tetranucleotídeos em íntrons e em regiões intragênicas (TÓTH et al., 2000). Repetições de mononucleotídeos estão frequentemente presentes nas regiões que controlam o sistema de reparo do DNA, desde procariotos até em humanos (CHANG et al., 2001). Os marcadores microssatélite também são associados a diversos outros mecanismos celulares como, por exemplo, organização da cromatina, regulação da atividade gênica e de processos metabólicos, tais como transcrição, tradução, replicação e recombinação (LI et al., 2002), associados com a pressão de seleção positiva nos processos meióticos (LI et al., 2002) e com a especificidade da síntese de determinados aminoácidos (MORGANTE et al., 2002).

Uma das limitações para o uso de marcadores microssatélite é a quantidade de tempo e recursos financeiros necessários para o desenvolvimento dos iniciadores utilizados na amplificação destes via PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Entretanto, estudos de transferibilidade pelo uso de iniciadores heterólogos mostram que é possível reduzir o custo e o tempo das pesquisas biológicas (PARKER et al., 1998). Uma alta taxa de transferibilidade de iniciadores tem sido observada entre

espécies de planta (WHITE et al., 1997; COLLEVATTI et al., 1999; ZUCCHI et al., 2003; BRAGA et al., 2007), entre espécies de cervídeos (ROED, 1998a; LEITE et al., 2007), entre papagaios (RUSSELLO et al., 2001; TAYLOR et al., 2006; CAPARROZ et al., 2007), bovinos e caprinos (ENGEL et al., 1996; KUHN et al., 1996; ROED, 1998; SLATE et al., 1998), entre cachorros e raposas (FREDHOLM et al., 1995) e entre humanos e chimpanzés (DEKA et al., 1994).

Devido às amplas vantagens descritas anteriormente, estes marcadores têm sido amplamente utilizados em diversas áreas como genética forense (HENKE et al., 2001; TRACEY, 2001; DEJEAN et al., 2004), estudos de parentesco (BLOUIN et al., 1996; VAN DE CASTEELE et al., 2001; COLLEVATTI et al., 2007), estudos de paternidade (MARSHALL et al., 1998; SLATE et al., 2000; ALCAIDE et al., 2005) e estrutura de populações e conservação (PAETKAU et al., 1999; COLLEVATTI et al., 2001; EIZIRIK et al., 2001; BALLOUX E LUGON-MOULIN, 2002).

Em aves, os primeiros marcadores microssatélite foram identificados em uma espécie de andorinha (*Hirundo rústica*) e em *flycatcher* (*Ficedula hypoleuca*) (ELLEGREN 1991, 1992). Entre os psitacídeos, os primeiros marcadores STR foram descritos para uma espécie neotropical, o *Forpus passerinus* (HUGHES et al., 1998). Posteriormente, foram desenvolvidos marcadores microssatélite para várias espécies de psitacídeos neotropicais, como por exemplo, para o papagaio da Ilha de St. Vicent (*Amazona guildinguii*) (RUSSELLO et al., 2001; RUSSELLO et al., 2005), para a arara-canindé (*Ara ararauna*) (CAPARROZ, 2003), e para o papagaio-do-Congo (*Psittacus erithacus*) (TAYLOR et al., 2007).

Em estudos de aves, nos quais certos tipos de informações são difíceis de serem obtidas apenas por observação direta no campo, estudos genéticos realizados com o auxílio de ferramentas como os marcadores microssatélite, podem fornecer evidências para melhor compreensão da estrutura populacional e do comportamento nestas espécies.

1.5 A espécie *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro)

A espécie *Amazona aestiva*, conhecida popularmente como papagaio-verdadeiro, é um representante neotropical da família Psittacidae, pertencente à Ordem Psittaciformes. Os indivíduos representantes desta espécie não apresentam dimorfismo sexual, apresentam porte

médio, com cerca de 37 cm de comprimento e 400g de peso, a coloração é predominantemente verde, apresentando fronte e loros azuis, cabeça amarela e pés e bico pretos (FORSHAW, 1989) (Figura 3).

A distribuição desta espécie é ampla, ocorrendo do nordeste do Brasil, passando pelo leste da Bolívia e do Paraguai, até o norte da Argentina (FORSHAW, 1989; SICK, 1997). Taxonomicamente, *A. aestiva* é representada por duas subespécies, as quais se diferenciam principalmente pela coloração do encontro das asas: *A. a. aestiva* apresenta o encontro da asa vermelho e ocorre no Brasil oriental; enquanto que *A. a. xanthopteryx* apresenta o encontro das asas e coberteiras pequenas superiores amarelo, e ocorre no Brasil ocidental, Bolívia, Paraguai e Argentina (DARRIEU, 1983) (Figura 3). Nos estados brasileiros do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul existe uma área de sobreposição, onde se podem encontrar indivíduos com o encontro das asas de coloração mista vermelha e amarela (Figura 3).

Os papagaios-verdadeiros são vistos em bandos, principalmente durante a noite (SEIXAS et al., 2000) e nestes é possível sempre notar os casais pareados. São aves de hábitos monogâmicos e fiéis. Durante o período reprodutivo, nidificam em diversos tipos de árvores, vivas ou mortas, encontradas isoladas em pastos, em áreas de savanas abertas, em manchas de floretas e preferencialmente em áreas alagadas (SEIXAS E MOURÃO, 2002).

O casal se reproduz apenas uma vez por ano e o período reprodutivo ocorre entre setembro e fevereiro (FORSHAW, 1989; SICK, 1997). Isso pode ser explicado pelo comportamento evolutivo da espécie, uma vez que os filhotes são dependentes do cuidado parental por um longo período, cerca de quatro a cinco meses, até os filhotes adquirirem capacidade de vôo e saírem ninho (FORSHAW, 1989; SICK, 1997). A fêmea põe de dois a quatro ovos que são chocados durante 24 a 29 dias, gerando um a três filhotes/ano em média.

O papagaio-verdadeiro destaca-se como a espécie mais popular entre os papagaios por ser considerado como um animal sociável, relativamente inteligente, além de ser capaz de imitar as palavras humanas, adquirindo um notável vocabulário (SICK, 1997), além de apresentar uma coloração exuberante da plumagem (FORSHAW, 1989).

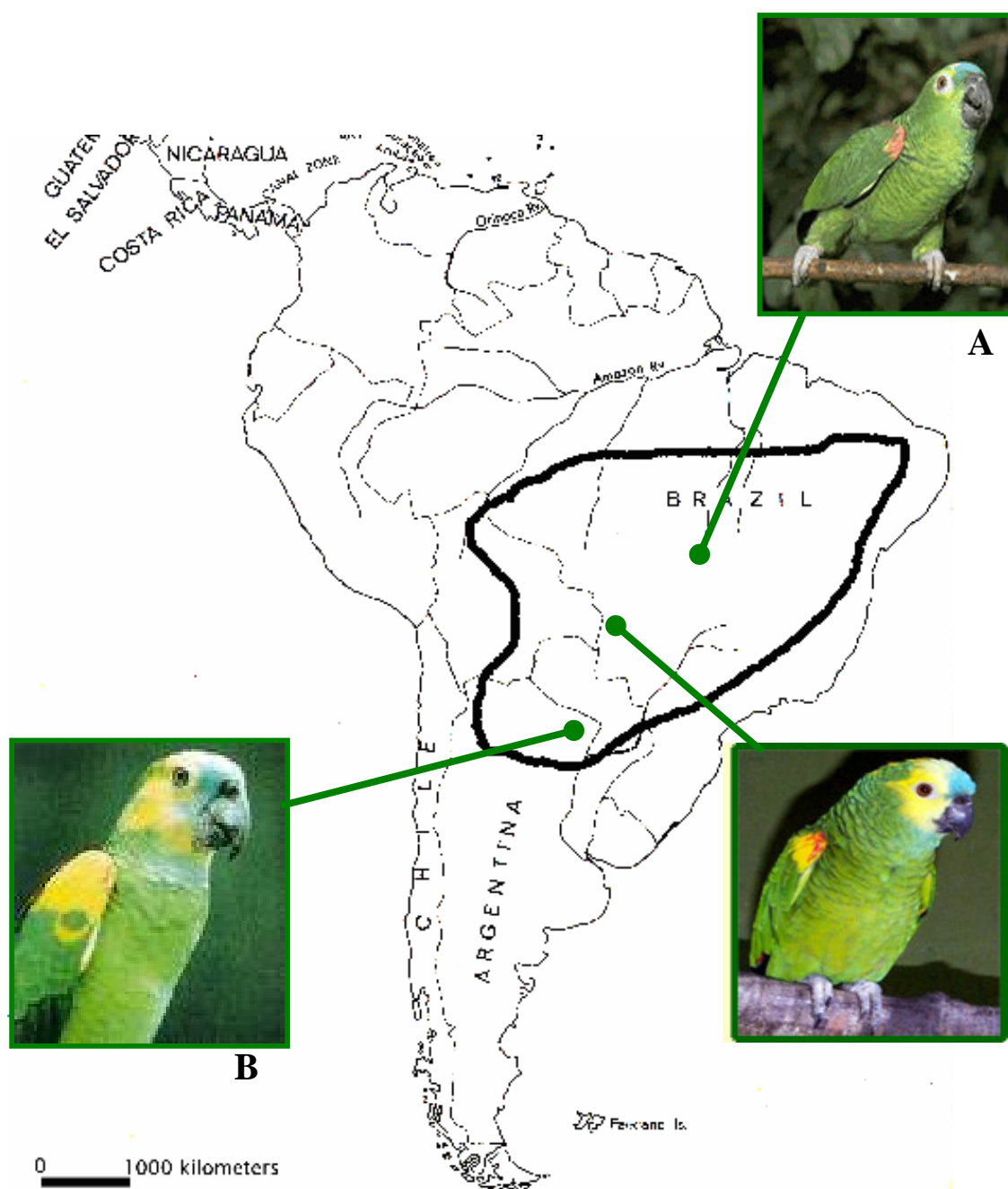


Figura 3: Distribuição geográfica do papagaio- verdadeiro (*Amazona aestiva*) e das duas subespécies atualmente reconhecidas: A) *A. a. aestiva*; B) *A. a. xanthopteryx*.

Para a IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) essa espécie é classificada como *Least Concern* devido a sua distribuição ampla, de aproximadamente 4.200.000 km². O tamanho populacional não foi ainda quantificado, mas acredita-se que este seja grande o suficiente para classificar esta espécie como abundante em grande parte de sua distribuição. Uma importante ameaça às populações naturais de *A. aestiva* é a interferência da

espécie humana nos ecossistemas. Devido ao aumento acelerado das populações humanas, e conseqüentemente, a crescente expansão das atividades agropecuárias, construção de usinas hidroelétricas, o aumento da exploração imobiliária e o desflorestamento, o habitat natural desta espécie tem sido progressivamente destruído. (COLLAR E JUNIPER, 1988). Estudos realizados na Argentina apontam um tipo pontual de ameaça em relação ao habitat natural desta espécie, mostrando que aproximadamente 40% das árvores utilizadas como ninho para a reprodução são derrubadas no momento da captura de filhotes (BOLKOVIC E RAMADORI, 2006). Fatores naturais, como tempestades, fogo e competição por cavidades ocupadas por abelhas, marimbondos, formigas, corujas, outros psitacídeos e pequenos vertebrados como gambás e sagüis, também estão relacionados à perda de ambiente natural (COLLAR, 1988).

Outra importante ameaça a esta espécie é o captura de filhotes e/ou adultos para abastecer o comércio ilegal de animais silvestres. Existem alguns levantamentos pontuais realizados em território brasileiro indicando a dimensão da atividade do tráfico ilegal desta espécie no Brasil. Entre 1988 e 1998, o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) localizado na cidade Campo Grande/MS recebeu cerca de 2.000 filhotes de papagaio-verdadeiro decorrente de apreensão dos animais retirados ilegalmente da natureza (SEIXAS E MOURÃO, 2000). Em apenas dois municípios do Mato Grosso, o papagaio-verdadeiro foi o psitacídeo mais encontrado como animal de estimação, representando cerca de 30% dos psitacídeos em cativeiro (PINHO et al., 2000). Desde 1981, a espécie *A. aestiva* está incluída no Apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*).

Segundo o levantamento realizado pela Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres (RENCTAS, 2002), de cada 10 animais capturados, somente um chega vivo ao consumidor, os demais morrem durante a captura ou transporte. Como a maioria das aves capturadas é composta de filhotes, a taxa de recrutamento pode estar seriamente comprometida, ou seja, o número de filhotes que nascem na população natural pode ser significativamente menor do que o número de filhotes que permanecem nesta. Esta espécie sempre foi uma presença comum nos lares no Brasil e no exterior, como animal de estimação. No Brasil, desde 1967 (lei nº 5.197 de 3 de janeiro de 1967), é proibido a utilização, perseguição, destruição, caça ou apanha de animais silvestres, bem como de seus ninhos, abrigos e criadouros naturais. Entretanto, a partir de 1997, o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA – através das portarias 117 e 118-N de 15 de outubro de 1997, tornou lícita a criação de animais da fauna

silvestre nacional para fins comerciais. Desde então, um número crescente de criadores tem se dedicado à criação comercial do papagaio-verdadeiro.

Segundo GOULART (2006), existia 26 criadouros comerciais de psitacíformes em atividade, todos tendo o papagaio-verdadeiro como foco principal. Atualmente, existem aproximadamente 60 criadouros comerciais de *A. aestiva* em plena atividade (IBAMA, 2007). O dobro de criadouros comerciais abertos no intervalo de apenas um ano indica que estão sendo tomadas iniciativas para que seja evitado o tráfico ilegal dessa espécie, permitindo a compra desses animais de forma legal pela sociedade a fim de atender ao mercado de animais de estimação. Porém, a retirada desses animais na natureza ainda ocorre com alta frequência de forma ilegal em praticamente toda sua área de distribuição para proporcionar maiores lucros aos criadouros.

Mesmo esta espécie apresentando ampla distribuição geográfica e sendo a mais capturada na natureza, informações sobre a biologia e ecologia em condições naturais são restritos a estudos realizados na Argentina, na Província de Salta (BOLKOVIC E RAMADORI, 2006) e em Córdoba (FERNANDEZ-JURIDIC et al., 1998), e no Brasil, na região do Pantanal sul-mato-grossense (SEIXAS E MOURÃO, 2000; SEIXAS E MOURÃO, 2002). Estudos genéticos são ainda mais escassos, restringindo-se a estudos filogenéticos e biogeográficos (EBERHARD E BERMINGHAM, 2004; RIBAS et al., 2007; RUSSELLO E AMATO, 2004). O único estudo populacional foi realizado por CAPARROZ (1998) envolvendo um grupo de indivíduos provenientes da região leste da Bahia baseado na técnica de identificação individual pelo DNA (*DNA fingerprinting*).

As populações de papagaio-verdadeiro estão sofrendo forte impacto das atividades humanas, principalmente no que tange ao tráfico ilegal e a constante degradação de seu habitat, o que pode representar alterações significativas na manutenção e evolução das populações naturais desta espécie. Desta forma, se medidas de conservação efetivas não forem adotadas em um curto espaço de tempo, nos próximos anos o papagaio-verdadeiro poderá ser incluído nas listas oficiais de espécies ameaçadas. Portanto, informações sobre a biologia, ecologia e variabilidade genética se fazem extremamente necessários. Com a utilização de marcadores moleculares STR é possível se obter uma ampla visão do cenário comportamental e genético de *A. aestiva* permitindo o estabelecimento de referências aplicáveis a esta espécie, o que é extremamente fundamental na definição de metas e estratégias para subsidiar a elaboração de futuros programas de conservação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral analisar a estrutura genética de cinco populações naturais de *Amazona aestiva* (Psittacidae, Psittaciforme, Aves) e verificar se estas apresentam efeito de gargalo genético (*genetic bottleneck*), bem como analisar a biologia reprodutiva desta espécie quanto aos aspectos da monogamia e da fidelidade ao ninho. Com os resultados obtidos neste trabalho pretende-se gerar informações sobre a variabilidade genética e o comportamento reprodutivo desta espécie, proporcionando subsídios para a elaboração de futuros programas de conservação.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Analisar a estrutura genética do papagaio-verdadeiro em escala geográfica, incluindo populações de Argentina, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Minas Gerais e Tocantins;

2.2.2 Analisar o efeito de gargalo genético nas cinco populações estudadas;

2.2.3 Avaliar o comportamento monogâmico;

2.2.4 Verificar se há fidelidade ao ninho pelo casal entre uma estação reprodutiva e outra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização das amostras e extração de DNA

Foram coletadas 172 amostras de *A. aestiva* em quatro estados do Brasil: Tocantins (TO), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG) e Mato Grosso do Sul (MS); e na Província del Chaco, no norte da Argentina (Tabela 1, Figura 4). As amostras coletadas na Argentina, no DF e MS são pertencentes a uma, três e quatro estações reprodutivas, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Locais de obtenção das 172 amostras de *A. aestiva* (abreviatura); N: número de amostras obtidas em cada região; Ano no qual as amostras foram obtidas (por apreensão) ou coletadas (referindo-se à estação reprodutiva na qual a coleta foi realizada); coordenadas geográficas dos locais de coleta.

Locais de coleta	N	Ano	Coordenadas geográficas
Gurupi – Tocantins (TO)	15	2006	11°43'44''S, 49°04'08''W
Distrito Federal (DF)	24	2004/2005/2006	14°47'03''S, 47°55'25''W
Parque Nacional Grande Sertão	10	2001	15°17'06''S, 46°03'33''W
Veredas - Minas Gerais (MG)			
Pantanal Sul Matogrossense – Mato Grosso do Sul (MS)	81	2000/2001/2004/2005	20°15'24''S, 56°21'21''W
Província del Chaco - Argentina (AR)	42	2004	28°04'28''S, 59°13'48''W
Total	172	-	-

As amostras provenientes de MS e da Argentina foram obtidas por meio de parcerias estabelecidas com o “Projeto papagaio-verdadeiro” coordenado pela Bióloga Gláucia Helena Fernandes Seixas e com o “Projeto Loro Hablador”, coordenado pelo Biólogo Igor Berkunsky, respectivamente. As amostras de MG e de TO foram obtidas por apreensões realizadas pelo IBAMA nestes estados. Toda amostragem foi composta de filhotes de até três meses de vida.

Para a obtenção de amostras de DNA foram coletados cerca de 0,2 ml de sangue periférico da veia branquial da parte inferior da asa ou 3 a 4 penas em crescimento. O material coletado foi armazenado em microtubos de 1,5 ml contendo 0,7 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente.

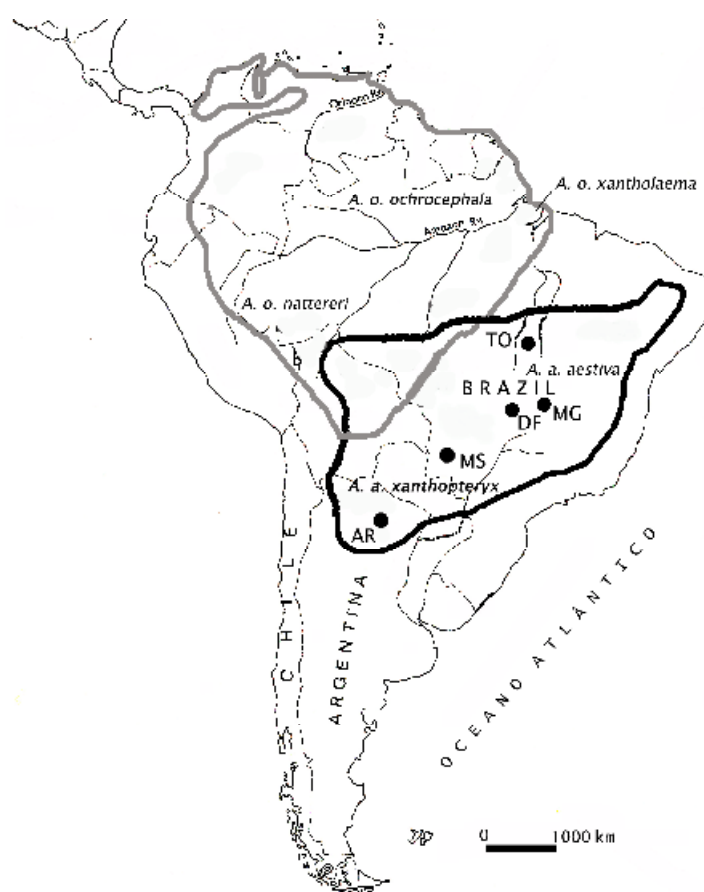


Figura 4: Locais de obtenção das amostras de *Amazona aestiva* (Ver abreviação Tabela 1)

O DNA foi extraído de todas as amostras de sangue coletadas, utilizando o protocolo de digestão com SDS 10% e proteinase K seguida de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) conforme descrito por BRUDFORD e colaboradores (BRUDFORD et al., 1992).

3.2 Transferibilidade e caracterização dos locos microssatélites

Inicialmente, foram utilizados dois indivíduos de *A. aestiva* para testar a transferibilidade de 12 pares de iniciadores para amplificação de loco microssatélite desenvolvidos para o papagaio de St Vincent (*A. guildingui*) por RUSSELLO e colaboradores (RUSSELLO et al., 2001; RUSSELLO et al., 2005), e cinco pares desenvolvidos para arara-canindé (*Ara ararauna*) por CAPARROZ e colaboradores (CAPARROZ et al., 2003) (Tabela 2).

As reações de PCR foram feitas em um volume total de 10 µl contendo 0,5 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria, BR), 200 µM de dNTP, tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), e 9,0 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em um termociclador PE 9700 (Applied Biosystems, MD) nas seguintes condições: 95°C por 7 min; 35 ciclos de: 95°C por 1 min, 48 a 59°C por 1 min (de acordo com a temperatura de anelamento de cada iniciador), 72°C por 1 min; e um ciclo final a 72°C por 20 min. As reações para alguns pares de iniciadores foram otimizadas utilizando o ciclo *touchdown* como descrito por RUSSELLO e colaboradores (RUSSELLO et al., 2001). Os produtos das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Os pares de iniciadores que apresentaram produtos de amplificação único e do tamanho esperado foram analisados em gel de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata (BASSAM et al., 1991) para analisar o polimorfismo. Os locos microssatélite foram caracterizados quanto ao número de alelos e intervalo de tamanho dos alelos obtidos (Tabela 2).

Os locos mais polimórficos (com cinco alelos ou mais) foram seqüenciados para verificar se a região amplificada corresponde à região do microssatélite. Para isto, indivíduos homozigotos foram seqüenciados utilizando o iniciador direto (*forward*) e o kit de seqüenciamento DYEnamicTM ET terminator (Amersham Pharmacia, Biotech, Sweden) conforme instruções do fabricante, em seqüenciador automático de DNA (ABI Prism 377 automated DNA, Perkin-Elmer, CA).

Esses locos foram então utilizados para a genotipagem de 22 amostras de *A. aestiva* coletadas em MS (2000/2001). Quatro iniciadores foram marcados com fluorescência azul - 6-FAM, três com fluorescência verde HEX, e dois com fluorescência amarela NED. As reações de PCR foram diluídas 1:3 em três multiplexes com locos microssatélites marcados com diferentes fluorescências, da seguinte maneira: UnaCT43(FAM), AgGT72 (FAM) e AgGT21(HEX); AgGT22(FAM), AgGT83(HEX) e AgGT12(NED); e AgGT29(HEX), AgGT07(NED) e AgGT90(FAM). Um microlitro de cada reação diluída 1:3 foi adicionado a 0,25 µL do marcador interno (GeneScan 500 internal lane standard, ROX, Perkin-Elmer, CA), 0,45 µL de tampão de corrida (25mM EDTA e 50 mg/ml Blue-Dextran) e 2,3 µL de formamida deionizada. As reações de genotipagem foram denaturadas a 95°C por 3 min, mantidas em gelo e submetidas a eletroforese em géis desnaturantes de poliacrilamida 5% em um seqüenciador automático de DNA (ABI Prism

377 automated DNA, Perkin-Elmer, CA). Os produtos foram interpretados utilizando os programas Genescan (Perkin-Elmer, CA) e Genotyper 2.1 (Perkin Elmer).

Esses locos foram caracterizados quanto à heterozigosidade observada e esperada com o auxílio do programa GDA (LEWIS, 2001). Foi testado se estes se encontravam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (NEI, 1978), e avaliados quanto ao equilíbrio de ligação (Tabela 3) utilizando o programa *FSTATS* 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A distribuição das frequências alélicas, bem como a identificação dos alelos privados, para cada loco microsatélite e para cada população é demonstrada graficamente no Anexo 9.2. Adicionalmente, foram estimadas a probabilidade de identidade genética (I) (CHAKRAVARAT E LI, 1983), a qual corresponde a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso apresentarem o mesmo genótipo, e a exclusão de paternidade (Q) (WEIR, 1996), que corresponde ao poder de excluir um falso candidato à paternidade escolhido ao acaso. A probabilidade combinada da exclusão de paternidade, $QC=1-[\prod (1-Q_i)]$ e a probabilidade combinada da identidade genética $IC= \prod I_i$ também foram estimadas (Tabela 3).

Os locos que se apresentaram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e em equilíbrio de ligação foram utilizados para estudo da estrutura genética e parentesco.

3.3 Estrutura Genética

3.3.1 Seleção das amostras

O tamanho amostral foi reduzido baseado em dois critérios: (1) eliminação dos indivíduos supostamente aparentados, e (2) o período de coleta. Os motivos para a seleção das amostras são descritos a seguir:

(1) Partindo da suposição de que os indivíduos coletados no mesmo ninho são irmãos, a amostragem para as populações da Argentina, DF e MS foi restrita a uma amostra de cada ninho. No caso das amostras obtidas por apreensão (MG e TO) foi verificado se havia o compartilhamento de 50% dos alelos em cada loco por comparação par a par entre todos os indivíduos de cada uma das populações. Não foram encontrados indícios de que quaisquer dois indivíduos amostrados ao acaso fossem irmãos, portanto, ambas não foram reduzidas em seus tamanhos amostrais.

(2) Como o intervalo entre geração em *A. aestiva* é de aproximadamente quatro anos (R. Caparroz, com. pessoal), as amostras provenientes de diferentes estações reprodutivas coletadas na Argentina, no DF, MG e TO foram tratadas como pertencentes a uma mesma geração (Tabela 1). Como a população de MS continha amostras provenientes dos anos 2000/2001 e dos anos 2004/2005 (Tabela 1) foi verificado se essas duas amostragens eram compostas de frequências alélicas distintas, o que poderia ser interpretado como amostras pertencentes a gerações diferentes. Essa análise foi realizada utilizando o programa *FSTATS* 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Verificou-se que não havia diferenciação entre as duas amostragens de MS ($\theta = 0,007$; $p = 0,227$), logo, as análises seguintes foram realizadas considerando somente as amostras provenientes das estações reprodutivas de 2004/2005. Essa seleção foi estabelecida por duas razões: esta última amostragem apresentava um número menor de indivíduos ($N_e = 24$) do que às amostragens obtidas nas estações reprodutivas de 2000/2001 ($N_e = 27$), o que aproxima os tamanhos populacionais entre as cinco populações estudadas, e também devido à proximidade estacional em relação às demais amostragens realizadas.

Ao final do estabelecimento destes critérios, foram utilizadas 74 amostras de *A. aestiva* distribuídas em cinco populações geográficas da seguinte maneira: 15 do TO, 11 do DF, 10 de MG, 24 do MS e 14 da Argentina.

3.3.2 Análise genética

Para esta análise foram utilizados seis pares de iniciadores (AgGT07, AgGT12, AgGT21, AgGT29, AgGT72 e AgGT83). O nível de endocruzamento dentro das populações de *A. aestiva* e a diferenciação entre as populações foram mensurados a partir dos coeficientes de S. WRIGHT (1951): f (coeficiente de endogamia), θ (índice de fixação) e F (coeficiente de endogamia total), respectivamente, obtidos pela análise de variância das frequências alélicas (COCKERHAM, 1969) utilizando o programa *FSTATS* 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A significância estatística foi baseada em 10.000 randomizações seguida pela correção de Bonferroni (GOUDET et al., 1996). Como a maioria das mutações que ocorrem em marcadores microsatélites envolve a adição ou subtração de uma unidade de repetição, de acordo com o modelo SMM (OTHA e KIMURA 1973; VALDES et al., 1993; SLATKIN, 1995), a diferenciação genética entre as populações também foi estimada pelo R_{ST} (SLATKIN, 1995), obtido pela análise de variância do tamanho dos alelos (GOODMAN,

1997). R_{ST} pode ser interpretado como uma correlação do tamanho dos alelos de diferentes indivíduos de uma mesma população. Este índice é análogo ao θ , com exceção que para θ , a correlação entre as frequências alélicas de diferentes indivíduos na mesma população considera que os alelos são idênticos por descendência (COCKERHAM, 1969; WEIR E COCKERHAM, 1984).

3.4 Gargalo genético

Devido à intensa captura de indivíduos de *A. aestiva* em populações naturais para abastecimento do tráfico ilegal de animais silvestres, além do acelerado ritmo de fragmentação e degradação de habitats naturais devido ao crescente e intenso impacto das atividades humanas, foi verificado se a diversidade genética encontrada nas populações estudadas foi influenciada por reduções populacionais drásticas. A análise foi realizada com o auxílio do programa *Bottleneck* (CORNUET E LUIKART, 1996). Para esta análise foram utilizadas as mesmas amostras e os mesmos locos selecionados para a análise de estrutura genética (tópico anterior).

Em uma população que sofreu efeito de gargalo genético (redução no tamanho populacional ou *genetic bottleneck*), a redução da diversidade alélica (heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg) ocorre mais rápida do que a redução da heterozigosidade esperada pelo equilíbrio mutação-deriva para o número de alelos encontrados na população (CORNUET E LUIKART, 1996). Baseada nesse princípio, o programa estima para cada população e para cada loco a distribuição da diversidade alélica esperada pelo número observado de alelos (k), dado um tamanho amostral (n), sobre a hipótese do equilíbrio entre mutação e deriva. Essa distribuição é obtida através da simulação de um processo de coalescência de n locos baseada estritamente no modelo de mutação SMM (OHTA E KIMURA, 1973) ou na proporção diferencial de SMM e TPM (DI RIENZO et al., 1994). Foram realizadas duas análises, uma assumindo estritamente SMM e outra assumindo 70% das mutações para o modelo SMM e 30 % para o modelo TPM. A redução significativa na heterozigosidade média foi realizada pelo teste estatístico não paramétrico "Wilcoxon sign-rank test" (LUIKART et al., 1998). Adicionalmente, foi obtida a distribuição de frequência alélica, para todos os locos, e para cada população. A distribuição das frequências alélicas esperada em uma população que não sofreu um efeito de gargalo genético

recente é representada graficamente em forma de “L”, com muitos alelos nos intervalos de baixa frequência e poucos alelos nos intervalos de alta frequência (LUIKART et al., 1998a).

3.5 Parentesco e fidelidade ao ninho

3.5.1 Seleção das amostras

O tamanho amostral foi reduzido da seguinte maneira: foram eliminados 27 indivíduos incluindo amostras de ninhadas de um ninhego e não reamostradas em outra estação reprodutiva, e também aquelas obtidas por apreensão, provenientes de TO e MG (respectivamente 15 e 10 indivíduos). Para a análise de parentesco foram analisadas 44 ninhadas com mais de um ninhego (filhote) distribuídas da seguinte maneira: 12 na Argentina, 24 em MS e oito no DF, totalizando 115 indivíduos. Para o estudo de fidelidade ao ninho, foram analisados sete ninhos (cinco do MS e dois do DF). Com exceção de um ninho que possui ninhadas amostradas em três estações reprodutivas diferentes, todos possuíam ninhadas amostradas em duas estações reprodutivas diferentes.

3.5.2 Análise genética

Para testar a hipótese de monogamia e de fidelidade ao ninho entre estações reprodutivas diferentes foi calculado o valor da razão de verossimilhança (LOD) entre as duas hipóteses testadas (LOD = verossimilhança da hipótese primária / verossimilhança da hipótese nula) para cada par de indivíduos com o auxílio do programa *Kinship 1.2* (GOODNIGHT E QUELLER, 1999). Na hipótese primária deste trabalho, os indivíduos foram considerados como sendo irmãos ($r_m = r_p = 0,5$; onde r_m e r_p significam a probabilidade dos indivíduos possuírem um alelo idêntico por descendência por parte da mãe e do pai, respectivamente), enquanto na hipótese nula, os indivíduos foram considerados como não relacionados ($r_m = r_p = 0,0$). Também foi estimada a probabilidade da ocorrência de erro tipo II (rejeitar a hipótese nula sendo esta verdadeira) para os valores de $p < 0,05$, $0,01$ e $0,001$. Os valores estatisticamente significativos de cada estimativa do valor da razão de verossimilhança (LOD) foi obtida pelo método de simulação implementado pelo mesmo programa.

Foi estimado o valor de parentesco entre os indivíduos (r - *relatedness*) descritos por QUELLER e GOODNIGHT (1989) também com o auxílio do programa *Kinship 1.2* (GOODNIGHT E QUELLER, 1999). Esse valor é obtido pela frequência de um determinado alelo no indivíduo x ($0,5$ para heterozigoto e $1,0$ para homozigoto) em relação a frequência do mesmo alelo no indivíduo y , sendo ambas frequências reduzidas da frequência deste alelo na população total. As frequências alélicas obtidas pela genotipagem de todos os indivíduos foram utilizadas em 1.000 simulações para obtenção da amplitude de variação dos valores de r (*relatedness*) descritos para três hipóteses de relação genética: não relacionados ($r_m = r_p = 0,0$), meio-irmãos ($r_m = 0,5; r_p = 0,0$) e irmãos ($r_m = r_p = 0,5$). Os valores de r foram utilizados para verificar o efeito do erro tipo II para os casos nos quais o LOD foi não significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Transferibilidade e caracterização dos locos microsatélite

De 17 pares de marcadores microsatélite analisados, 14 apresentaram produtos de amplificação (Tabela 2). Com exceção de cinco pares de marcadores (UnaCT74, UnaGT55, AgGT08, AgGT17 e AgGT22), os locos microsatélite analisados apresentaram produtos de amplificação dentro do intervalo (tamanho) observado nas espécies para os quais foram desenvolvidos (Tabela 2). Foram identificados dez locos microsatélite polimórficos, sendo nove destes com cinco alelos ou mais, e para esses últimos, o número de alelos por loco variou entre cinco (AgGT22) e 17 alelos (AgGT83) (Tabela 2) com média de 10,8 alelos por loco.

Tabela 2. Características dos 17 pares de locos microsatélite desenvolvidos para as espécies *A. guildingui*^{1,2} e *Ara ararauna*³, testados em 22 indivíduos de *A. aestiva* provenientes do Pantanal Sul-Matogrossense.

Loco	Unidade de repetição	T _A	N _A	Tamanho (pb)
UnaCT21 ¹	(GT) _n (CTT)(GT) _n	-	-	-
UnaCT32 ¹	(GT) _n	-	-	-
UnaCT43 ¹	(GT) _n	52	6	199-211 (199-219)
UnaCT74 ¹	(GT) _n	50	1	211 (232-270)
UnaGT55 ¹	(GT) _n (AT) _n	50	1	166 (184-192)
AgGT02 ²	(GT) _n	-	-	-
AgGT04 ²	(GT) _n	48	4	254-262 (264-272)
AgGT07 ²	(GT) _n	50	12	257-283 (271-284)
AgGT08 ²	(GT) _n (GCGT) _n	52	1	304 (321-330)
AgGT12 ²	(GT) _n	58→50	15	299-333 (296-303)
AgGT17 ²	(GT) _n	58→50	1	419 (421-427)
AgGT21 ²	(GT) _n	50	16	306-340 (307-318)
AgGT22 ³	(CA) _n	59	5	190-198 (199-211)
AgGT29 ³	(CA) _n	59	12	190-224 (199-203)

Continuação: Tabela 2

Loco	Unidade de repetição	T _A	N _A	Tamanho (pb)
AgGT72 ³	(CA) _n	50	14	270-302 (283-291)
AgGT83 ²	(GT) _n	58→50	17	231-275 (247-271)
AgGT90 ³	(GT) _n	58→50	13	196-232 (216-228)

¹Caparroz *et al.* (2003); ²Russello *et al.* (2001), ³Russello *et al.* (2005); T_A(°C), temperatura de anelamento otimizada para *A. aestiva* via “touchdown” (indicado por seta) ou PCR padrão; N_A, número de alelos; intervalo entre o tamanho mínimo e máximo do alelo em pares de base (pb) observado nas amostras de *A. aestiva* e nas espécies para as quais foram desenvolvidos (entre parênteses).

Os nove locos que apresentaram cinco alelos ou mais foram selecionados para a caracterização (Tabela 3). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a heterozigosidade observada e a heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção para os locos AgGT22 e UnaCT43 (Tabela 3). Os locos AgGT07 e AgGT90 encontraram-se em desequilíbrio de ligação ($p > 0,001786$). As probabilidades combinadas de exclusão de paternidade e de identidade genética apresentaram valores altos (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização de nove locos microssatélite amplificados por iniciadores desenvolvidos para as espécies *A. guildingui*^{1,2} e *Ara ararauna*³, testados em 22 indivíduos de *A. aestiva*.

Loco	He	Ho	<i>f</i>	<i>Q</i>	<i>I</i>
AgGT07 ¹	0,824	0,850	-0,015	0,678	0,079
AgGT12 ¹	0,931	0,912	0,033	0,803	0,032
AgGT21 ¹	0,921	0,798	0,115	0,820	0,028
AgGT22 ²	0,527	0,217	0,655*	0,449	0,222
AgGT29 ²	0,831	0,824	0,028	0,683	0,074
AgGT72 ²	0,911	0,889	0,041	0,790	0,038
AgGT83 ¹	0,935	0,958	-0,028	0,828	0,026
AgGT90 ²	0,830	0,818	0,049	0,697	0,072
UnaCT43 ³	0,741	0,348	0,472*	0,493	0,206
Total	0,833	0,729	0,132	QC = 0,9998	IC = 1,684x10⁻¹¹

¹ Russello *et al.* (2001), ² Russello *et al.* (2005), ³ Caparroz *et al.* (2003); He, heterozigosidade esperada; Ho, heterozigosidade observada; *f*, coeficiente de endocruzamento (significativo para todos os locos seguidos de *: $p < 0,00010$, valor nominal ajustado); *Q*, probabilidade de exclusão de paternidade; *QC*, probabilidade combinada de exclusão de paternidade; *I*, probabilidade de identidade; *IC*, probabilidade combinada de identidade genética.

Análises comparativas utilizando os locos AgGT22 e UnaCT43 indicaram alterações significativas nos resultados em relação às análises realizada sem estes locos, apresentando valores maiores de f para cada população e valores de θ que não pareciam condizer com a distribuição geográfica das populações.

Com exceção dos locos AgGT22, UnaCT43 e AgGT90, todos os demais locos foram utilizados nas análises de estrutura populacional e da biologia reprodutiva. Os seis locos microsatélites selecionados para as análises apresentaram probabilidade combinada de identidade genética igual a $3,23 \times 10^{-09}$ e probabilidade combinada de exclusão de paternidade igual a 0,9998.

4.2 Estrutura Genética

Não foi observada diferença significativa entre os valores da heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada pelo EHW para as cinco populações estudadas, resultando em valores de f não significativos ($p > 0,00167$), o que indica que essas populações não apresentam deficiência de heterozigotos e que os acasalamentos são randômicos dentro das populações (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização genética das cinco populações de *A. aestiva*, baseadas em seis marcadores microsatélite.

População	N	A	He	Ho	f
AR	14	11,60	0,892	0,903	-0,013
MS	24	14,33	0,873	0,795	0,091
DF	11	10,83	0,916	0,871	0,052
MG	10	9,50	0,880	0,900	-0,024
TC	15	12,16	0,895	0,900	0,012
Total	74	11,68	0,891	0,875	

N, número de indivíduos; A, número médio de alelos; He, heterozigosidade esperada; Ho, heterozigosidade observada; f , coeficiente de endocruzamento (não significativo para todos os locos; $p > 0,00167$, valor nominal ajustado); abreviação das populações ver tabela 1.

A maioria dos valores de θ foi muito próxima de zero, variando entre -0,003 (AgGT21) e 0,033 (AgGT07) (Tabela 5). O valor total do θ (0,012) indicou uma significativa, porém, baixa diferenciação genética ($p > 0,0007$) entre as populações estudadas (Tabela 5). Os valores de R_{ST}

foram, para a maioria dos locos, menores do que os valores de θ , variando entre -0,011 (AgGT29) e 0,049 (AgGT07) e apresentou um valor total não significativo ($R_{ST} = 0,007$; $p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Estrutura genética de cinco populações de *A. aestiva* baseada na análise da variância das frequências alélicas e no tamanho dos alelos para seis locos microssatélites (R_{ST}).

Loco	f	θ	F	R_{ST}
AgGT07 ¹	-0,015	0,033	0,019	0,047
AgGT12 ¹	0,033	0,002	0,035	-0,009
AgGT21 ¹	0,115	-0,003	0,112	-0,007
AgGT29 ²	0,028	0,034	0,061	-0,011
AgGT72 ²	0,041	0,007	0,048	0,022
AgGT83 ¹	-0,028	0,005	-0,037	0,000
Total	0,028	0,012*	0,040	0,007

¹ Russello *et al.* (2001), ² Russello *et al.* (2005), f , coeficiente de endocruzamento (não significativo para todos os locos; $p < 0,00167$, valor nominal ajustado); θ , índice de fixação (significativo para valor seguido de *; $p < 0,0007$, valor nominal ajustado); F, coeficiente de endocruzamento total; R_{ST} , diferenciação genética populacional baseada no tamanho dos alelos.

O valor de θ entre pares de população foi significativo somente para as populações mais distantes geograficamente, ou seja, a significância atribuída ao θ total ($\theta = 0,012$; Tabela 5) pode ser derivada do desvio provocado pelo θ estimado entre as populações da AR e de TO ($\theta = 0,007$) (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de θ par a par para cinco populações de *A. aestiva* baseada na análise de seis locos microssatélites

	AR	MS	DF	MG
	Valores de θ			
MS	0,007			
DF	0,020	0,010		
MG	0,023	0,021	0,010	
TO	0,007*	0,001	0,011	0,029

$p = 0,005$; θ significativo para valor seguido de *; abreviação das populações ver Tabela 1; número de indivíduos em cada população ver Tabela 4.

4.3 Gargalo Genético

Para as duas análises realizadas (uma assumindo estritamente o modelo SMM e outra assumindo 70% das mutações para o modelo SMM e 30 % para o modelo TPM) não foi detectado excesso de heterozigotos nas cinco populações ($p > 0,05$), indicando que não há evidência de redução drástica recente no tamanho populacional. As frequências alélicas dentro de cada população mantiveram o padrão de distribuição esperado pelo equilíbrio entre mutação e deriva, com a maioria dos alelos apresentando-se em uma baixa frequência e poucos alelos apresentando-se em alta frequência (Figura 5).

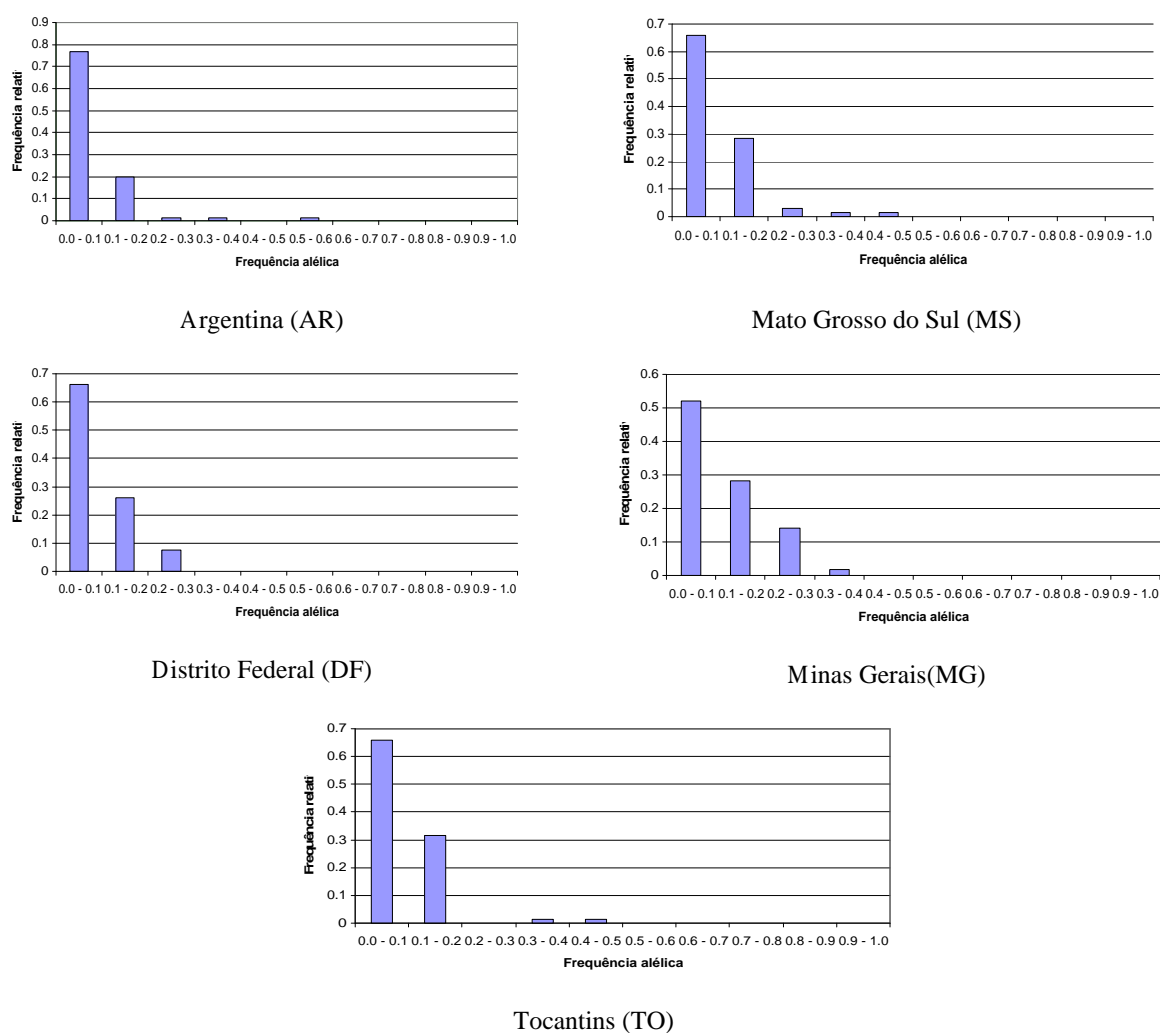


Figura 5: Distribuição em classes das frequências alélicas para as cinco populações estudadas de *A. aestiva* segundo o programa *Bottleneck*.

4.4 Parentesco e fidelidade ao ninho

No estudo de parentesco, das 44 ninhadas analisadas, 40 (91%) apresentaram valores da razão de verossimilhança (LOD) estatisticamente significativos (Tabela 7), indicando que os indivíduos amostrados no mesmo ninho podem ser irmãos.

Tabela 7: Resultados da análise de filhotes de *A. aestiva* encontrados no mesmo ninho em diferentes localidades; razões de verossimilhança (LOD) e estimativa das relações genéticas (r - *relatedness*) obtidas pela análise de seis locos de microssatélite.

Ninho	Localidade	LOD	r
1	AR ₂₀₀₄	***	0,522
2	AR ₂₀₀₄	***	0,394
3	AR ₂₀₀₄	**	0,519
4	AR ₂₀₀₄	*	0,540
5	AR ₂₀₀₄	**	0,406
6	AR ₂₀₀₄	**	0,490
7	AR ₂₀₀₄	*	0,721
8	AR ₂₀₀₄	**	0,434
9	AR ₂₀₀₄	**	0,503
10	AR ₂₀₀₄	*	0,601
11	AR ₂₀₀₄	***	0,796
12	AR ₂₀₀₄	*	0,360
14	MS ₂₀₀₀	***	0,456
15	MS ₂₀₀₀	ns	-0,024
16	MS ₂₀₀₀	**	0,315
16 [#]	MS ₂₀₀₄	**	0,416
17	MS ₂₀₀₀	**	0,261
18	MS ₂₀₀₀	ns	0,152
19	MS ₂₀₀₀	ns	0,136
19	MS ₂₀₀₄	ns	0,210
20	MS ₂₀₀₀	***	0,683
21	MS ₂₀₀₀	**	0,550
22	MS ₂₀₀₁	***	0,403
23	MS ₂₀₀₄	***	0,718
24	MS ₂₀₀₄	***	0,343
25	MS ₂₀₀₄	***	0,392
26	MS ₂₀₀₄	***	0,584
27	MS ₂₀₀₄	**	0,621
28	MS ₂₀₀₄	***	0,568
29	MS ₂₀₀₄	***	0,671
30	MS ₂₀₀₅	**	0,827
31	MS ₂₀₀₅	***	0,599
32	MS ₂₀₀₅	***	0,584
33	MS ₂₀₀₅	*	0,663
34	MS ₂₀₀₅	**	0,525
35	MS ₂₀₀₅	***	0,552
36	DF ₂₀₀₄	*	0,613

Continuação Tabela 7

Ninho	Localidade	LOD	<i>r</i>
36 [#]	DF ₂₀₀₆	*	0,759
37	DF ₂₀₀₄	***	0,486
38	DF ₂₀₀₄	**	0,227
39	DF ₂₀₀₅	*	0,613
39 [#]	DF ₂₀₀₆	*	0,759
40	DF ₂₀₀₆	*	0,243
41	DF ₂₀₀₆	**	0,517

valores significativos de LOD para $p < 0,001 = ***$; $p < 0,01 = **$; e $p < 0,05 = *$; ninhos reamostrados em mais de uma estação reprodutiva seguidos de [#]; ns: LOD não significativo.

Os valores de LOD não significativos podem ser explicados pela ocorrência de erro tipo II (aceitar a hipótese nula sendo ela falsa). Com base nos seis locos microssatélite analisados, a proporção de ocorrência de erro tipo II observada foi de 4% para valor de $p = 0,05$. As simulações realizadas para verificar a possibilidade de ocorrência de erro tipo II evidenciaram uma sobreposição grande de valores de r entre as diferentes hipóteses analisadas (irmãos, meio-irmãos e não relacionados) (Figura 6). Os valores de r para as quatro ninhadas que apresentaram LOD não significativo encontraram-se dentro da distribuição observada para os valores de relação de primeiro grau (Tabela 7, Figura 6). Contudo, devido à ampla sobreposição de valores das três hipóteses de parentesco, não é possível descartar as outras duas.

Dos sete ninhos utilizados no estudo de fidelidade ao ninho (amostrados em estações reprodutivas diferentes) três apresentaram valores da razão de verossimilhança (LOD) estatisticamente significativos entre as ninhadas analisadas, indicando que para estes três casos os casais provavelmente utilizaram o mesmo ninho em estações reprodutivas diferentes. Para os demais ninhos, o valor de LOD não significativo pode ser devido a erro tipo II. Com exceção de um dos ninhos (ninho 13), os valores de r para os casos onde o valor de LOD foi não significativo encontraram-se na área de sobreposição das três hipóteses de parentesco (ninho 18: $r = 0,239$; ninho 19: $r = 0,210$; ninho 21: $r = 0,252$; Figura 6) indicando que não é possível atribuir uma relação de parentesco entre os indivíduos das ninhadas amostradas em diferentes estações reprodutivas. Para o ninho 13 o valor de r (-0,185) foi encontrado na área de sobreposição somente das hipóteses de meio-irmãos e não relacionados.

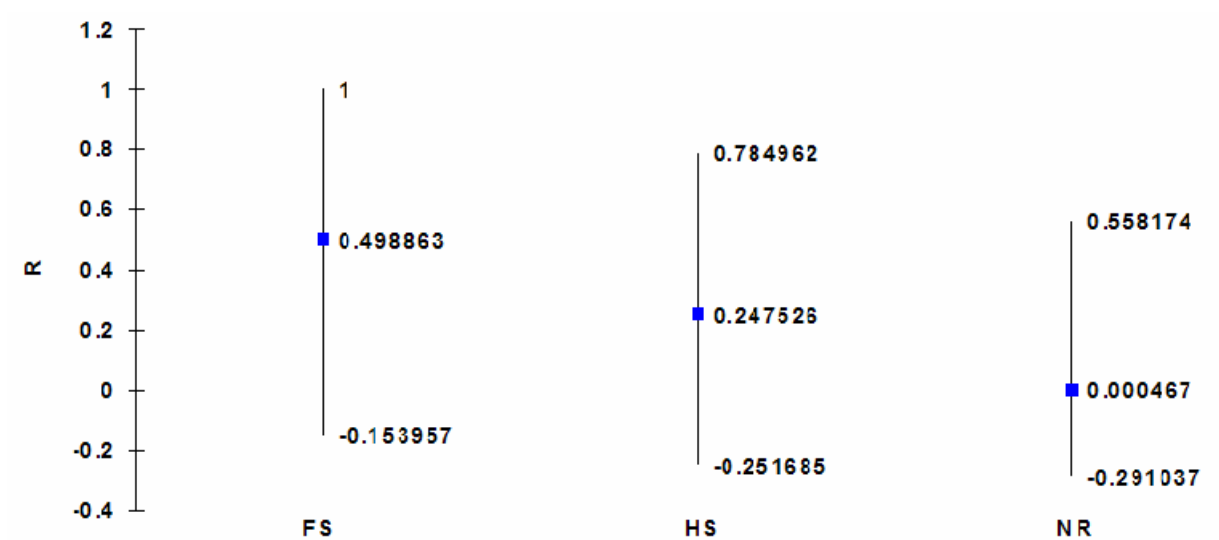


Figura 6: Valores dos índices de relação genética (r) entre pares de indivíduos obtidos por simulação (1.000 réplicas) utilizando as frequências alélicas estimadas para 115 amostras de *A. aestiva* com seis locos de microssatélite pelo programa *Kinship 1.2.*; FS—irmãos; HS—meio-irmãos; e NR—não relacionados.

5. DISCUSSÃO

5.1 Transferibilidade e caracterização dos locos microssatélites

A utilização de iniciadores heterólogos representa uma grande vantagem tendo em vista o alto custo para o desenvolvimento desses marcadores, e tem sido observada em diversos estudos, como por exemplo, entre espécies de famílias diferentes e mesma ordem como bovinos, cervos e caprinos (ENGEL et al., 1996; KUHN et al., 1996; ROED, 1998; SLATE et al., 1998) e entre espécies de gêneros diferentes e mesma família como cervídeos (ROED, 1998a; LEITE et al., 2007), psitacídeos (RUSSELLO et al., 2001; TAYLOR et al., 2007) e canídeos (FREDHOLM et al., 1995).

A transferibilidade de 14 pares de iniciadores (Tabela 2) demonstrou que as seqüências que flanqueiam as regiões desses marcadores microssatélites são conservadas entre as espécies em questão. Porém, a maioria dos iniciadores testados não amplificou em temperatura de hibridação semelhante à utilizada para as espécies para as quais estes foram desenvolvidos. Para a maioria dos locos a temperatura de anelamento foi reduzida, variando entre um (AgGTO7, AgGT12, AgGT17), três (AgGT04) e sete graus Celsius (AgGT21, AgGT72, AgGT83, AgGT90). A ocorrência de mutações ou deleções no sítio de anelamento desses iniciadores é um fator que pode ter impedido a amplificação desses locos. Dos 12 iniciadores desenvolvidos para *A. guildingui* (RUSSELLO et al., 2001; RUSSELLO et al., 2005), 11 (92%) apresentaram amplificação e dos cinco desenvolvidos para *Ara ararauna* (CAPARROZ, 2003), apenas três apresentaram amplificação. Estes resultados já eram esperados pela relação filogenética das espécies, ou seja, uma maior transferibilidade entre espécies do mesmo gênero do que entre gêneros diferentes.

Para os seis marcadores microssatélites utilizados nas análises deste trabalho, os níveis de polimorfismo (média de 14,3 alelos por loco) e os valores de heterozigosidade esperada (0,830-0,915) (Tabelas 2 e 3) foram maiores do que os observados para outras espécies de psitacídeos. Por exemplo, para espécies ameaçadas de extinção como o papagaio-charão (*A. pretrei*), o papagaio-da-cara-roxa (*A. brasiliensis*) e o papagaio da Ilha de St. Vincent (*A. guildingui*), a média de alelos por loco foi menor do que a encontrada para *A. aestiva* (sendo 9,5, 7,5 e 4,2 respectivamente), bem como os valores de heterozigosidade esperada (entre 0,628-0,925, 0,469-0,844 e 0,190-0,800, respectivamente) (RUSSELLO et al., 2001, RUSSELLO et al., 2005; CAPARROZ et al., 2007 –

em anexo). Mesmo considerando uma espécie de ampla distribuição e não ameaçada de extinção esses valores também foram menores, como por exemplo, para o papagaio-do-congo (*Psittacus erithacus*) (média de 7,3 alelos para 12 locos microssatélite; heterozigosidade esperada entre 0,360 e 0,915) (TAYLOR, 2007).

Locos com poucos alelos, como AgGT07 e AgGT29 tendem a apresentar menor valor de heterozigosidade e consequentemente menor probabilidade de exclusão de paternidade e maior probabilidade de identidade genética (Tabela 3). A probabilidade combinada de identidade genética, isto é, a probabilidade de que dois indivíduos amostrados ao acaso em uma população apresentem genótipos idênticos para os seis locos, foi de 3.23×10^{-09} . Este valor mostra que estes marcadores microssatélites são úteis na discriminação de indivíduos de *A. aestiva*. O alto valor da probabilidade combinada de exclusão de paternidade (0,9998) também indica que estes marcadores podem permitir estudos detalhados de parentesco em populações naturais ou populações de cativeiro, mesmo em situações como a presente, nas quais a maternidade e paternidade não são identificadas *a priori*.

De uma forma geral, a caracterização dos marcadores STR utilizados neste trabalho proporciona novas perspectivas para a geração de dados fundamentais em estudos de estrutura populacional e conservação para populações *in situ* e *ex situ* de *A. aestiva* e de espécies relacionadas a esta.

5.2 Estrutura Genética

A análise de estrutura genética das populações de *A. aestiva* mostrou que há uma baixa diferenciação entre as cinco populações estudadas ($\theta = 0,012$; $p = 0,0007$; Tabela 5). Embora θ possa subestimar a diferenciação, o fato de R_{ST} ter sido menor que θ mostra que não há divergência entre identidade por descendência e por estado nos locos utilizados. Portanto, o valor de diferenciação genética encontrado realmente indica uma baixa diferenciação entre as populações de *A. aestiva*. A comparação par a par entre as populações indicou que a significância deste valor pode ter sido influenciada pelo valor de θ estimado entre as populações da Argentina e de Tocantins ($\theta = 0,007$; $p = 0,005$; Tabela 6). Como estas duas populações são as mais distantes geograficamente, a variabilidade genética observada parece estar distribuída de forma clinal,

conforme observado pela variação na coloração da plumagem das duas subespécies de *A. aestiva* descrita por DARRIEU (1983). Fenotipicamente, os papagaios da região oriental do Brasil apresentam encontro da asa vermelho (*A. a. aestiva*) e os da região da Bolívia, norte da Argentina e do Brasil ocidental apresentam encontro da asa amarelo (*A. a. xanthopteryx*), enquanto que no meio da distribuição são observados indivíduos com encontro da asa misto (DARRIEU, 1983) (Figura 3). Dessa forma, a evidente diferenciação fenotípica, assim como a encontrada pela análise dos seis marcadores microssatélite, só é encontrada entre os extremos da distribuição geográfica da espécie. Adicionalmente, *f* foi não significativo para cada uma das populações (Tabela 4) e considerando todas as populações (Tabela 5), indicando que o acasalamento entre indivíduos é aleatório dentro e entre as populações estudadas.

A dispersão a longa distância pode explicar o padrão encontrado, uma vez que *A. aestiva* pode voar a longas distâncias, aproximadamente de 1.000 a 3.000 hectares (SEIXAS E MOURÃO, 2000). A baixa, ou até mesmo não significativa estrutura genética de populações de psitacídeos já foi verificada em outras espécies de aves que potencialmente podem voar a longas distâncias, como papagaios (e.g. *Amazona auropalliata*, WRIGHT et al., 2005), araras (CAPARROZ, 2003) e passeriformes (MACDOUGALL-SHACKLETON E MACDOUGALL-SHACKLETON, 2001).

Adicionalmente, a diferenciação entre as populações da Argentina e do Tocantins, nos extremos da distribuição, pode ser explicada pela hipótese de introgressão proposta por RIBAS e colaboradores (2007). Segundo essa hipótese, as espécies *A. ochrocephala* e *A. aestiva* formam um grupo parafilético (RUSSELLO E AMATO, 2004; EBERHARD E BERMINGHAM, 2004) compartilhando haplótipos devido ao processo de hibridização. RIBAS e colaboradores verificaram que há duas linhagens mitocondriais diferentes: uma composta basicamente por indivíduos de *A. a. aestiva* (região centro-nordeste da distribuição geográfica da espécie), e *A. o. xantholaema*; outra linhagem composta por *A. a. aestiva*, *A. a. xanthopteryx* (oeste-sudoeste da distribuição geográfica da espécie), *A. o. nattereri*, *A. o. ochrocephala*. Além disso, foi verificado que as duas linhagens mitocondriais se misturam em uma área que coincide com a região onde não foi verificada diferenciação genética significativa para os seis marcadores microssatélites analisados (região de MS, DF e MG), o que supostamente, poderia indicar tal região como a “região de contato” (hibridização) entre as linhagens. Adicionalmente, aves com o encontro da asa misto (amarelo e vermelho) são encontradas na região do Pantanal Sul-Mato-Grossense (MS) (DARRIEU, 1983), o que fornece uma evidência morfológica de hibridização das duas linhagens.

Adicionalmente, Areta identificou uma nova variante morfológica da característica em questão em uma população do noroeste da Argentina em uma região chamada Sierra de Santa Bárbara (CSB) (Areta, 2007). Amostras provenientes do oeste de CSB apresentaram uma variação maior do que a esperada, com indivíduos com encontro das asas verde, misto e amarelo, enquanto que os indivíduos amostrados na região leste de CSB apresentaram somente coloração amarela (Areta, 2007). Essa ampla variação morfológica (característica de zona de hibridização) na região sudoeste da distribuição de *A. aestiva* sustenta a hipótese de tal região ser considerada a área de contato das duas linhagens.

É importante ressaltar que para fornecer maior subsídio à inferência evolutiva proposta, bem como ao atual padrão filogenético de *A. aestiva*, além de proporcionar mais informações sobre os fatores envolvidos na estruturação populacional, deve ser realizado um estudo incluindo tanto populações em áreas de sobreposição com subespécies de *A. ochrocephala*, quanto um maior número de populações do papagaio-verdadeiro abrangendo uma maior cobertura geográfica desta espécie.

5.3 Gargalo genético

Os riscos de extinção são maiores em populações pequenas, nas quais os processos responsáveis pela redução da variabilidade genética são acentuados (FRANKLIN, 1980; SOULÉ, 1987; FRANKHAM, 1995; FRANKHAM et al., 2002a) e a recuperação de um tamanho viável para a redução ou eliminação destes riscos pode ser uma tarefa difícil e demorada (TEMPLE, 1986; GLENN et al., 1999; BAUM et al., 2003). Caso a detecção de uma redução populacional (efeito de gargalo genético ou *genetic bottleneck*) seja tardia, provavelmente a população não terá tempo suficiente para se adaptar às consequências tais como perda da variabilidade genética, maior efeito da deriva genética e de depressão endogâmica (LUIKART et al., 1998a). Portanto, verificar o comportamento demográfico das populações naturais permite que sejam definidas e estabelecidas, caso necessárias, estratégias de conservação que sejam efetivas em tempo hábil para evitar o surgimento ou aumento dos riscos de extinção.

Neste trabalho foi utilizado o teste de CORNUET e LUIKART (1996) para conferir a proporção de heterozigotos e verificar se a distribuição alélica dentro das populações de *A. aestiva* tem sido interferida pelo tamanho das mesmas. A análise das frequências alélicas, baseada no

modelo de mutação SMM e na proporção de 70% deste último e 30% do modelo TPM, mostrou que estas se comportam como o esperado para populações que apresentam equilíbrio entre mutação e deriva genética (a maioria dos alelos apresentou-se em baixa frequência e poucos alelos apresentaram-se em alta frequência) (Figura 5) (CORNUET E LUIKART, 1996). Sendo assim, não há evidências de que as populações em questão tenham sofrido efeito de gargalo genético.

Porém, outros fatores tornam-se muito preocupantes na análise da variação demográfica das populações do papagaio-verdadeiro. Por exemplo, durante este estudo na região do DF, mais precisamente no ano de 2005, houve uma grande queimada em uma das áreas de coleta que compreende a área das Estações Ecológicas do Jardim Botânico e do IBGE, e uma temporada de consecutivas tempestades que afetou principalmente a área da Estação Ecológica Águas Emendadas. Esses eventos não foram somente responsáveis pela perda de ovos e filhotes, como também pela perda de cavidades nas respectivas áreas de reprodução. Outro fator agravante foi a grande quantidade de ovos furtados durante as estações reprodutivas de 2005 e 2006, para, supostamente, serem utilizados no aumento de lucros em criadouros comerciais legalizados ou para o abastecimento do tráfico ilegal. Outros trabalhos mostram que ovos e filhotes desta espécie são intensamente capturados (BOLKOVIC E RAMADORI, 2006; GOULART, 2006; PINHO et al., 2000; SEIXAS E MOURÃO, 2000), o que pode interferir diretamente na taxa de recrutamento das populações naturais (número de filhotes/número de ovos). Além disso, o ritmo acelerado da fragmentação e degradação de habitats naturais devido ao crescente e intenso impacto das atividades humanas também pode contribuir efetivamente para a redução de populações naturais do papagaio-verdadeiro.

Esses dados associados ao fato do papagaio-verdadeiro viver cerca de 70 anos (FORSHAW, 1989; SICK, 1997) gera uma grande preocupação para os estudiosos dessas populações naturais. É possível que as populações de *A. aestiva* que vemos hoje sejam compostas principalmente por indivíduos velhos, e quando estes começarem a morrer, em poucas gerações essas populações poderão sofrer um gargalo genético, o que futuramente poderá impulsionar a redução da variabilidade genética tornando essa espécie mais vulnerável aos vários fatores associados ao aumento dos riscos de extinção.

Vale salientar que os efeitos decorrentes de tais ameaças podem ainda não ter sido percebidos e detectados devido a fatores como a longevidade e o tempo de geração desta espécie,

porém são efeitos que podem interferir diretamente na distribuição e no tamanho das populações de papagaio-verdadeiro em médio e longo prazo.

5.4 Parentesco e fidelidade ao ninho

O papagaio-verdadeiro, assim como a maioria dos psitacídeos, é considerado uma espécie estritamente monogâmica, vivendo rigorosamente aos casais (FORSHAW, 1989; SICK, 1997 SEIXAS E MOURÃO, 2000). As bases que sustentam esta afirmação são quase exclusivamente constituídas de observações de campo do comportamento de casais durante o período reprodutivo. Apesar das limitações técnicas inerentes deste tipo de estudo, como a dificuldade em observar a ocorrência de acasalamentos extra-par esporádicos, a fidelidade entre os pares desta espécie é amplamente aceita pela comunidade ornitológica.

O advento das técnicas moleculares tem fornecido maior embasamento para refutar a hipótese de monogamia de diversas espécies de aves antes consideradas estritamente monogâmicas (GRIFFITH et al., 2002; ALCAIDE et al., 2005), e mesmo assim, ainda há, para espécies de psitacídeos, poucos estudos relacionados ao comportamento reprodutivo que corroborem ou refutem a hipótese de monogamia dos casais. Em 2001, CAPARROZ e colaboradores avaliaram a hipótese de monogamia para duas espécies de araras, *Ara ararauna* e *Ara chloroptera*, analisando nove e 16 amostras de cada espécie, respectivamente (CAPARROZ et al., 2001). Até o momento não há estudos genéticos relacionados ao comportamento reprodutivo do papagaio-verdadeiro. Desta forma, os resultados deste estudo são importantes para a compreensão do comportamento reprodutivo de *A. aestiva* em populações naturais.

Os resultados fornecem evidências que corroboram a hipótese de monogamia para esta espécie. Para 40 ninhadas (91%) das 44 analisadas, a razão de verossimilhança (LOD) obtida pela análise de seis locos microsatélite foi estatisticamente significativa, sugerindo que estes filhotes podem ser irmãos. Nas demais comparações, os resultados não foram estatisticamente significativos. Porém, isto não invalida a hipótese de que os filhotes analisados possam ser irmãos. O nível de significância do teste aplicado pelo programa (*Kinship*) é determinado empiricamente por meio de simulações empregando as frequências alélicas observadas. O método utilizado identifica a proporção de erros do tipo II (aceitar a hipótese nula sendo esta falsa) para um determinado nível de significância obtida na estimativa do parâmetro. Com base nos seis locos

microssatélite, a proporção de erro tipo II observada foi de 4% ($p = 0,05$), proporção que poderia ser atribuída aos casos onde a hipótese de monogamia não foi aceita. Para os casos de parentesco onde o valor de LOD foi não significativo, foram verificados os valores de r atribuídos, os quais se encontraram na área de sobreposição das três hipóteses de parentesco (irmãos, meio-irmãos e não relacionados) (Tabela 7, Figura 6), o que dificulta a inferência da relação genética para estes casos exclusivamente com base na análise dos seis pares de locos microssatélite. De maneira geral, os resultados obtidos indicam fortes evidências de monogamia para *A. aestiva* (hipótese aceita em 91% dos casos), o que conseqüentemente, elimina a hipótese de ocorrência de acasalamento extra-par para esta espécie.

Para três das sete análises realizadas o estudo de fidelidade ao ninho apresentou evidências de que os casais de *A. aestiva* voltam à mesma cavidade em diferentes estações reprodutivas. Estudos ecológicos, de observação e de análise do ambiente dos sítios reprodutivos auxiliam no levantamento de algumas hipóteses que podem justificar os resultados obtidos. Para os três casos onde a hipótese de fidelidade ao ninho foi aceita, é sugerido que a baixa densidade de papagaios-verdadeiros ou de outros competidores por cavidades sejam responsáveis por uma maior disponibilidade de ninhos, o que facilita o regresso dos casais a tais regiões. Outra justificativa é a alta disponibilidade de alimentos ou a baixa densidade de predadores nos sítios de reprodução possibilitando o retorno dos casais ano após ano.

Os resultados mostram, também, que *A. aestiva* pode apresentar um comportamento flexível em relação a fidelidade ao uso de cavidade, o que pode ser vantajoso para uma espécie que compete por cavidade. Evidências de competição por cavidade foram observadas em alguns locais (no DF, observação pessoal e MS, G. Seixas, com. pessoal). Em um dos casos no qual a hipótese de fidelidade ao ninho não foi aceita (ninho 13) há evidências obtidas por observação de campo de que realmente não foi o mesmo casal que utilizou o ninho em estações reprodutivas diferentes (neste caso, 2000 e 2004), o que mostra o quanto é importante o monitoramento constante dos indivíduos nas populações naturais, e principalmente, o quanto a análise molecular desse tipo de comportamento pode auxiliar na inferência de hipóteses relacionadas ao comportamento reprodutivo para espécies de aves.

5.2.1 Implicações para conservação

As populações do papagaio-verdadeiro são vulneráveis aos efeitos da fragmentação do habitat, principalmente no que tange a perda de potenciais áreas de reprodução, e aos altos níveis de captura para abastecimento do tráfico ilegal de animais silvestres (BUCHER E MARTELLA, 1988; COLLAR E JUNIPER, 1988). Essas ameaças devem ser consideradas caso seja necessário estabelecer estratégias de conservação para esta espécie, uma vez que essas podem ser responsáveis pela redução do tamanho populacional, e consequentemente, do fluxo gênico e da variabilidade genética dentro e entre populações naturais. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que estas ameaças não têm provocado forte impacto na estrutura genética e na diversidade das populações do papagaio-verdadeiro.

Contudo, devido a alta expectativa de vida desta espécie, é provável que os impactos provocados por tais ameaças não puderam, ainda, ser detectados. Um estudo sobre a flutuação demográfica das populações do papagaio-verdadeiro em longo prazo provavelmente poderá elucidar quais são os fatores associados com a manutenção ou alteração da variabilidade genética de tais populações. Infelizmente, os problemas atualmente reconhecidos e associados à vulnerabilidade das populações do papagaio-verdadeiro podem ser acentuados nas gerações futuras caso não sejam tomadas medidas de conservação, e assim, uma menor variabilidade genética pode ser acentuada pela redução repentina do tamanho populacional e pelo isolamento de tais populações.

Em relação à estruturação genética encontrada, e do ponto de vista de Unidade de Manejo – MU (MORITZ, 1994), no qual tais unidades são representadas pela diferenciação das frequências alélicas entre as populações, os resultados obtidos pela análise de seis marcadores microssatélite, favoreceriam o estabelecimento de tais unidades de forma clinal, tal como se encontram distribuídas as variabilidades genética e morfológica para as cinco populações estudadas. Seria ideal o estabelecimento de unidades de manejo nos extremos da distribuição, tanto para preservar as populações geneticamente distintas (Argentina e Tocantins) quanto as populações fenotipicamente distintas (com o encontro da asa amarelo no sul da distribuição e com encontro da asa vermelho no norte da distribuição), e ao longo da distribuição das populações, onde os resultados obtidos neste trabalho indicam que há fluxo (não há diferenciação genética entre as

populações do MS, DF e MG) e os dados morfológicos evidenciam que há mistura entre as populações dos extremos (encontro da asa misto).

Por outro lado, a análise filogenética deste *taxon* mostra que *A. a aestiva* e *A. a. xanthopteryx* não são subespécies válidas, ou seja, o padrão estabelecido pela taxonomia atual não reflete a evolução destas subespécies (RIBAS et al., 2007). Portanto, focar esforços baseados na taxonomia atual poderia direcionar erroneamente as estratégias de conservação para o complexo de espécies (*A. aestiva*- *A. ochrocephala*) no qual se encontram as subespécies em questão. Nesse sentido, é importante reforçar a necessidade de uma revisão taxonômica deste complexo.

Adicionalmente, os resultados das análises de parentesco e fidelidade ao ninho fornecem informações importantes sobre o comportamento reprodutivo do papagaio-verdadeiro. Espera-se que tais informações auxiliem na elaboração dos planos de manejo *in situ* e *ex situ* e que contribuam não somente com a conservação da espécie *per si*, mas também com a conservação e preservação do habitat onde vivem e reproduzem as populações naturais do papagaio-verdadeiro.

7. CONCLUSÕES

1 - A transferibilidade de 14 marcadores microssatélite, sendo nove destes polimórficos (com cinco alelos ou mais por loco), e a utilização de seis marcadores microssatélites com baixa probabilidade combinada de identidade genética e alta probabilidade combinada de exclusão de paternidade proporciona novas perspectivas para a geração de dados fundamentais em estudos de parentesco e de estrutura genética e conservação para populações *in situ* e *ex situ* de *A. aestiva*.

2 – A análise de estruturação populacional mostrou que há fluxo gênico entre as populações estudadas ao longo da distribuição (MS, DF e MG) e baixa diferenciação genética entre os extremos (Argentina e Tocantins).

3 – Os resultados obtidos pela análise de efeito de gargalo genético para as cinco populações estudadas mostraram que não há evidências de redução drástica recente no tamanho populacional.

4 – Os resultados obtidos pela análise de parentesco entre os ninhegos fornecem fortes evidências que corroboram a hipótese de monogamia para a espécie *A. aestiva*. O estudo de fidelidade ao ninho mostrou que o papagaio-verdadeiro apresenta um comportamento flexível em relação à fidelidade ao uso de cavidade para reprodução.

9. REFERÊNCIAS

- ALCAIDE, M., NEGRO, J. J., et al. Extra-pair paternity in the Lesser Kestrel *Falco naumanni*: a re-evaluation using microsatellite markers. **Ibis**, v.147, n.608-611, 2005.
- ALLENDORF, F. W., LEARY, R. F. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: SOULÉ, M. E. (Ed.). **Conservation Biology. The Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. p. 57-86
- ARETA, J. I. A green-shouldered variant of the Turquoise-fronted Amazon *Amazona aestiva* from the Sierra de Santa Bárbara, north-west Argentina. **Cotinga**, v. 27, July, p. 71-73, 2007.
- AVISE, J. C., NEIGEL, J. E., et al. Demographic influences of mitochondrial DNA lineages survivorship in animal populations. **Journal of Molecular Ecology**, v. 20, p. 99-105, 1984.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. New York: Chapman e Hall, 1994. p.511
- BALLOUX, F., LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.11, p.155-165, 2002.
- BASSAM, B. J., CAETANO-ANOLLES, G., et al. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Annals of Biochemical**, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BAUM, J. K., MYERS, R. A., et al. Collapse and conservation of shark populations in the Northwest Atlantic. **Science**, v. 299, Jan, p. 389-392, 2003.
- BIRK, C. W.; FUERST, P.; MARUYAMA, T. Organelle diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparisons to nuclear genes. **Genetics**, v. 121, p. 613-627, 1989.
- BLEICH, V. C., WEHAUSEN, J. D., et al. Desert-dwelling mountain sheep: conservation implications of a naturally fragmented distribution. **Conservation Biology**, v.4, n.4, p.383-390, 1990.
- BLOUIN, M. S., PARSONS, M., et al. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. **Molecular Ecology**, v.5, p.393-401, 1996.
- BOLKOVIC, M. L., RAMADORI, D. Manejo de Fauna Silvestre em la Argentina. Programas de uso sustentable. **Dirección de Fauna Silvestre, Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires**, p. 15-25, 2006.
- BOUZAT, J. L, CHENG, H. H., et al. Genetic evaluation of a demographic bottleneck in the greater prairie chicken. **Conservation Biology**, v. 12, n. 4. Aug, p 836-843, 1998.

BRAGA, A. C., REIS, A. M. M., et al. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, 2007.

BRIGHTSMITH, D. J. Competition, predation and nest niche shifts among tropical cavity nesters: phylogeny and natural history evolution of parrots (Psittaciformes) and trogons (Trogoniformes). **Journal of Avian Biology**, v. 36, p. 64-73, 2005.

BRIGHTSMITH, D. J. Competition, predation and nest niche shifts among tropical cavity nesters: ecological evidence. **Journal of Avian Biology**, v. 36, p. 74-83, 2005a.

BRUDFORD, M. W., HANNOTE, O., et al. Single locus and multilocus DNA fingerprinting. In: HOEZEL, C. A. R. (ed). **Molecular genetic Analyses of Populations: a Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1992. p. 225-269

CAPARROZ, R. **Estudo de populações naturais de psitacídeos neotropicais (Psittaciformes, Aves) por técnica de identificação individual pelo DNA (“DNA fingerprinting”)**. p. 108. Dissertação de Mestrado. Biologia da conservação. Universidade de São Paulo, SP, 1998.

CAPARROZ, R., GUEDES, N. M. R., et al. Analysis of the variability and breeding behaviour of wild populations of two Macaw species (Psittaciformes, Aves) by DNA fingerprinting. **Ararajuba**, v. 9, n. 1, 43-49, 2001.

CAPARROZ, R., MYIAKI, C. Y., et al. Characterization of microsatellites loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.441-443, 2003.

CAPARROZ, R., LEITE, K. C. E., et al. Characterization of microsatellite loci in three species of Amazona (Psittaciformes) using heterologous primers. **Ornitological Neotropical**, v. 18. 2007

CASSEY, P., BLACKBURN, T. M., et al. Causes of exotic bird establishment across oceanic islands. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 272, Aug, p 2059-2063, 2005.

CASTRIC, V., BERNATCHEZ, L., et al. Heterozygote deficiencies in small lacustrine populations of brook charr *Salvelinus Fontinalis* Mitchill (Pisces, Salmonidae): a test of alternative hypotheses. **Heredity**, v. 89, Mar, p. 27-35, 2002.

CHAKRAVARAT, I., LI, C. C. The effect of linkage on paternity calculations. . In: WALKERA, R. H. (Ed.). **Inclusion Probabilities in Parentage Testing**. Arlington: American Association of Blood Banks, 1983. p.411-420

CHANG, D. K., METZGAR, D., et al. Microsatellites in eucaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. **Genome Research**, v.11, p.1145-1146, 2001.

CLAGG, S. M., SANDIE, M. D., et al. Genetics consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99,n. 12, Jun, p. 8127-8132, 2002.

COBLENTZ, B. E. Exotic organisms: a dilemma for conservation biology. **Conservation Biology**, v. 4, n. 3, Sep, p 261-265, 1990.

COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, p.72-84, 1969.

COLLAR, N. J., JUNIPER, A. T. Dimensions and causes of the parrot conservation crisis. In: S. BEISSINGER, S. R., SNYDER, N. F. R. (Ed). **New World Parrot in Crisis: Solutions from Conservation Biology**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1988. p. 3-21

COLLAR, N. J. Family Psittacidae (Parrots). In: DEL HOYO, J., ELLIOTT, A., et al. (Ed). **Handbook of the birds of the world**. Barcelona: Lynx Editions, v. 4, 1997. Sandgrouse to Coochos. p. 280-477.

COLLEVATTI, R. G., BRONDANI, R. V., et al. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, p.748-756, 1999.

COLLEVATTI, R. G., GRATTAPAGLIA, D., et al. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p.349-356, 2001.

COLLEVATTI, R. G., LEITE, K. C. E., et al. Evidence of high inbreeding in a population of the endangered giant anteater, *Myrmecophaga tridactyla* (Myrmecophagidae), from Emas National Park, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.1, p.112-120, 2007.

CORNUET, J. M., LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequencies data. **Genetics**, v.144, p.2001-2014, 1996.

CRANDALL, K. A., BININDA-EMONDS, O.R., et al. Considering evolutionary process in conservation biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, n. 7, p. 290-295, 2000.

DALEN, L., LINNELL, J. D. C., et al. Population structure in a critically endangered arctic fox population: does genetic matter? **Molecular Ecology**, v.15, p.2809-2819, 2006.

DARRIEU, C. A. Revision de las razas geograficas de *Amazona aestiva* (Linne), (Aves, Psittacidae). **Neotropica**, v.29, n.81, p.3-10, 1983.

DEJEAN, B. C., CROUAU-ROU, B., et al. Genetic variability in Amerindian populations of northern Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.4, p.489-495, 2004.

DEKA, R., SHRIVER, M. D., et al. Conservation of human chromosome 13 polymorphic microsatellite (CA)_n repeats in chimpanzees. **Genomics**, v.22, n.1, p.226-30, Jul 1, 1994.

DI RIENZO, A., PETERSON, A. C., et al. Mutational process of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.3166-3170, 1994.

EBERHARD, J. R., BERMINGHAM, E.. Phylogeny and biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. **The Auk**, v. 121, n. 2, p. 318-322, 2004.

EIZIRIK, E., KIM, J.-H., et al. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, v.10, p.65-79, 2001.

ELDRIDGE, M. D. B., KING, J. M., et al. Unprecedented low levels of genetic variation and inbreeding depression in a island population of the black-footed Rock-Wallaby. **Conservation Biology**, v. 13, n. 3, Jun, p 531-541, 1999.

ELLEGREN, H. DNA Typing of museum birds. **Nature**, v. 354, p. 113, 1991.

ELLEGREN, H. Polymerase Chain Reaction (PCR) of microsatellite – a new approach to studies of genetic relationship in birds. **The Auk**, v. 109, p. 886-895, 1992.

ENGEL, S. R., LINN, R. A., et al. Conservation of microsatellite loci across species of Artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy**, v.77, n.2, p.505-518, 1996.

ESTOUP, A., CORNUET, J-M. Microsatellite evolution: inferences from population data. In: GOLDSTEIN, D. B., SCHLÖTTERER, C. (Ed). **Microsatellites. Evolution and application**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 49-65

FERNANDEZ-JURIDIC, E., MARTELLA, M. B., et al. Vocalization of the blue-frontes amazon (*Amazona aestiva*) in the Chancine Reserve, Cordoba, Argentina. **Wilson Bull.**, v.110, n.3, p.352-261, 1998.

FORSHAW, J. M. **The Parrots of the World**. Willoughby: Lansdownem Press.1989. p. 584

FRANKHAM, R. Conservation Genetics. **Annual Review of Genetics**, v.29, Dec, p.305-327, 1995.

FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., et al. Genetics and extinction. In: FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., et al. (Ed.). **Introduction to Conservation Genetics**. New York: Cambridge University Press, 2002. p. 23-40

FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., et al. Effects of population size reduction. In: FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., et al. (Ed.). **Introduction to Conservation Genetics**. New York: Cambridge University Press, 2002a. p. 227-334

FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., et al. The broader context: population viability analysis (PVA). In: FRANKHAM, R., BALLOU, J. D., et al. (Ed.). **Introduction to Conservation Genetics**. New York: Cambridge University Press, 2002b. p. 502-528

FRANKLIN, I. R. Evolutionary change in small populations. In: SOULÉ, M. E., WILCOX, B. A. (Ed.). **Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980. p. 135-150

- FRASER, D. J., BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2741-2752, 2001.
- FREDHOLM, M., WINTERO, A. K. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. **Mammalian Genome**, v.6, n.1, p.11-8, Jan, 1995.
- FULLER, S. J., BULL, C. M., et al. Clustering of related individuals in a population of the Australian lizard, *Egernia frerei*. **Molecular Ecology**, v.14, p.1207-1213, 2005.
- FUNK, W. C., GREENE, A. E., et al. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. **Biology Letters**, v.49, n.1, Mar, p.13-16, 2005.
- GAUTSCHI, B., MÜLLER, J. P., et al. Effective number of breeders and maintenance of genetic diversity in the captive bearded vulture population. **Heredity**, v. 91, Feb, p. 9-16, 2003.
- GIBBS, H. L., DAWSON, R. J. G., et al. Limited differentiation in microsatellite DNA variation among northern populations of the yellow warbler: evidence for male-biased gene flow. **Molecular Ecology**, v.9, p.2137-2147, 2000.
- GILPIN, M. E., SOULÉ, M. E. Minimum viable populations: process of species extinction. In: SOULÉ, M. E. (Ed.). **Conservation Biology. The Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. p.19-34
- GILPIN, M. E. Spatial structure and population vulnerability. In: SOULÉ, M. E. (Ed.). **Viable Populations for Conservation**. New York: Cambridge University Press, 1987. p. 125-140
- GLENN, T. C., STEPHAN, W., et al. Effects of a population bottleneck on Whooping Crane mitochondrial DNA variation. **Conservation Biology**, v. 13, n.5, Oct, p. 1097-1107, 1999.
- GOLDSTEIN, D. B., POLLOCK, D. D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity**, v.88, p.335-342, 1997.
- GOLDSTEIN, D. B., SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites. Evolution and application**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 352
- GOODMAN, S. J. Rst Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, v.1997, 1997.
- GOODNIGHT, K. F., QUELLER, D. C. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.1231-1234, 1999.
- GOUDET, J., RAYMOND, M., et al. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, v. 144, p. 1933-1940, 1996.
- GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices**. Disponível em <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2002

GOULART, C. E. S. **Valores hematológicos de referência para papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva* – Psittacidae) mantidos em cativeiro.** p. 80. Dissertação de Mestrado, Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2006.

GRANT, P. R. Founder effect and silvereyes. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 99, n. 12, June, 7818-7820, 2002.

GRIFFITH, S. C., OWENS, I. P. F., et al. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptative function. **Molecular Ecology**, v.11, p.2195-2212, 2002.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v.79, n.2, p.413-425, 1998.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B., SCHLÖTTERER, C. (Ed). **Microsatellites. Evolution and application.** Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 2-9

HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, v. 396, Nov, p.41-49, 1998.

HARTL, D. L., CLARCK, A. G. Population Substructure. In: HARTL, D. L., CLARCK, A. G. (Ed). **Principles of population genetics.** Sunderland: Sinauer Associates, 1997. p. 111-158

HEDRICK, P. W., KALINOWSKI, S. T. Inbreeding depression in conservation biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 31, p.139-162, 2000.

HEDRICK, P. W., GUTIERREZ-ESPELETA, G. A., et al. Founder effect in an island population of bighorn sheep. **Molecular Ecology**, v. 10, Oct, p. 851-857, 2001.

HENKE, J., HENKE, L., et al. Application of Y-chromosomal STR haplotypes to forensic genetics. **Croatian Medical Journal**, v.42, n.3, p.292-297, 2001.

HOLT, R. D. Population-dynamics in 2-patch environments – Some anomalous consequences of an optimal habitat distribution. **Theoretical Population Biology**, v. 28, p. 181-208, 1985.

HUGHES, C., MELLAND, R., et al. Polymorphic trinucleotide microsatellite loci for a neotropical parrot, the green-rumped parrotlet, *Forpus passerinus*. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1247-1248, 1998.

IBAMA, 2007. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.** <http://www.ibama.gov.br>

IUCN, 2006. **2006 IUCN Red List of Threatened Species.** <http://www.redlist.org>

JUMP, A. S., PEÑUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n. 21, May, p.8096-8100, 2006.

JUNIPER, T., PARR, M. **Parrots: a guide to parrots of the world.** New Haven: Yale University Press, 1998. p. 584

KIMURA, M., WEISS, G. H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v.49, p.561-567, 1964.

KIMURA, M., CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v.49, p.725-738, 1964.

KUHN, R., ANASTASSIADIS, C., et al. Transfer of bovine microsatellites to the cervine (*Cervus elaphus*). **Animal Genetics**, v.27, p.199-201, 1996.

LEITE, K. C. E., COLLEVATTI, R. G., et al. Transferability of microsatellite loci from Cervidae species to the endangered Brazilian marsh deer, *Blastocerus dichotomus*. **Genetics and Molecular Research**, 2007.

LEVINS, R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. **Bulletin of the Entomology Society of America**, v. 71, p. 237-240, 1969.

LEWIS, P. O., ZAVKIN, D. Genetic data analysis: Computer program for the analysis of allelic data, version 1.0. Disponível em <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. 2001.

LI, Y.-C., KOROL, A. B., et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.2453-2465, 2002.

LITT, M., LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, n.3, Mar, p.397-401, 1989.

LUIKART, G., SHERMIN, W. B., et al. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. **Molecular Ecology**, v.7, p.963-974, 1998.

LUIKART, G., ALLENDORF, F. W., et al. Distortion of allele frequency distribution provides a test for recent population bottlenecks. **The American Genetic Association**, v. 89, p. 238-247, 1998a.

MACDOUGALL-SHACKLETON, E. A., MACDOUGALL-SHACKLETON, S. A. Cultural and genetic evolution in mountain white-crowned sparrows: song dialects are associated with population structure. **Evolution**, v. 55, p. 2568-2575, 2001

MARSHALL, T. C., SLATE, J., et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, p.639-655, 1998.

MORGANTE, M., HANAFEY, M., et al. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v.30, p.194-200, 2002.

MORITZ, C. Defining 'Evolutionary significant units' for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 373-375, 1994.

NEI, M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. **Genetics**, v.89, n.3, Jul, p.583-590, 1978.

OHTA, T., KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetical Research Cambridge**, v.22, p.201-204, 1973.

PAETKAU, D., AMSTRUP, S. C., et al. Genetic structure of the world's polar bear populations. **Molecular Ecology**, v.8, p.1571-1584, 1999.

PAETKAU, D. Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. **Conservation Biology**, v.13, n. 6, Dec, p. 1507-1509, 1999.

PARKER, P. G., SNOW, A. A., et al. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

PERES, C. A., BAIDER, C., et al. Demographic Threats to the Sustainability of Brazil Nut Exploitation. **Science**, v. 302, Dec, p. 2112-2114, 2003.

PILOT, M., JEDRZEJEWSKI, W., et al. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. **Molecular Ecology**, v.15, p.4533-4553, 2006.

PINHO, J. B., NOGUEIRA, F. M. B. Mostra da retirada de psitacideos em cativeiro na cidade de Cuiba e Pantanal de Pocone, Mato Grosso, no período 1995-1997. **Ararajuba**, v.8, n.1, p.51-53, 2000.

PRIMMER, C. R., ELLEGREN, H. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. **Molecular Biology**, v. 15, p. 997-1008, 1998)

PULLIAM, H. R. Sources, sinks, and population regulation. **The American Naturalist**, v. 132, p. 652-661, 1988.

QUELLER, D. C., GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v.43, n.2, p.258-275, 1989.

RAFALSKI, J. A., VOGEL, J. M., et al. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B., LAI, E. (Ed.). **Analysis of nonmammalian genomes: a practical guide**. New York: Academic Press, 1996. p.75-134

RALLS, K., HARVEY, P. H., et al. **Inbreeding in natural populations of birds and mammals**. In: SOULÉ, M. E. (Ed.). **Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. p.35-56

RENTAS, 2002. **Animais silvestres: vida à venda**. Brasília, p.260

RIBAS, C. C., TAVARES, E.S., et al. Phylogeny and biogeography of yellow-headed and blue-fronted parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with special reference to the American taxa. **Ibis**, 2007.

ROED, K.H. Microsatellite variation in Scandinavian Cervidae using primers derived from Bovidae. **Hereditas**, v. 129, p. 19-25, 1998.

ROED, K. H., MIDTHJELL, L. Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1773-1776, 1998a.

RUSSELLO, M. A., CALCAGNOTTO, D., et al. Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent parrot, *Amazona guildingui*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 162-164, 2001.

RUSSELLO, M. A., GLADYSHEV, E., et al. Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian far east. **Conservation Genetics**, v. 5, Apr, p. 707-713, 2004.

RUSSELLO, M. A., AMATO, G. A molecular phylogeny of *Amazona*: implications for neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p. 421-437, 2004.

RUSSELLO, M. A., LIN, K., et al. Additional microsatellite loci for the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingui*. **Conservation Genetics**, v. 6, p. 643-645, 2005.

RYDER, O. A. Using genetics to identify intraspecific conservation units: a critique of current methods. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 1, p. 9-10, 1986.

SACCHERI, I., KUUSSAARI, M., et al. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature**, v. 392, Apr, p. 491-494, 1998.

SEIXAS, G. H. F., MOURAO, G. M. Assessment of restocking blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Brazil. **Ararajuba**, v.8, n.2, p.73-78, 2000.

SEIXAS, G. H. F., MOURAO, G. M. Nesting success and hatching survival of the blue-fronted amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Field Ornithology**, v.73, n.4, p.399-409, 2002.

SHERWIN, W. B., TIMMS, P., et al. Analysis and conservation implications of Koala genetics. **Conservation Biology**, v. 13, n. 3, Jan, p. 639-649, 2000.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira, uma Introdução**. Nova Fronteira, Rio de Janeiro. 1997. p. 912

SLATE, J., COLTMAN, D. W., et al. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soya sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, v.29, p.307-315, 1998.

SLATE, J., MARSHALL, T., et al. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. **Molecular Ecology**, v.9, p.801-808, 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, p.457-462, 1995.

SOULÉ, M. E., WILCOX, B. A. **Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980. p. 395

SOULÉ, M. E, WILCOX, B. A. Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: SOULÉ, M. E, WILCOX, B. A (Ed.). **Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980a. p. 151-170

SOULÉ, M. E. **Conservation Biology. The Science of Scarcity and Diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. p. 584

SOULÉ, M. E. **Viable Populations for Conservation**. New York: Cambridge University Press, 1987. p. 189

STENSETH, N. C., CHAN, K.-S., et al. Common dynamic structure of Canada lynx populations within three climatic regions. **Science**, v. 285, Aug, p 1071-1073, 1999.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, n.16, Aug 25, p.6463-6471, 1989.

TAYLOR, B. L., DIZON, A. E. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 11-16, 1999.

TAYLOR, T.D., PARKIN, D. T. Characterization of 12 microsatellite primer pairs for the African grey parrot, *Psittacus erithacus* and their conservation across Psittaciformes. **Molecular Ecology Notes**, p. 163-167, 2007.

TEMPLE, S. A. Recovery of the endangered Mauritius Kestrel from an extreme population bottleneck. **The Auk**, v. 103, Jun, p. 632-633, 1986.

TERBORGH, J., WINTER, B. Some causes of extinction. In: SOULÉ, M. E., WILCOX, B. A. (Ed.). **Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates, 1980. p. 119-134

TÓTH, G., GASPARI, Z., et al. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p.967-981, 2000.

TRACEY, M. Short tandem repeat-based identification of individuals and parents. **Croatian Medical Journal**, v.42, n.3, p.233-238, 2001.

VALDES, A. M., SLATKIN, M., et al. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, v.133, p.737-749, 1993.

VAN DE CASTEELE, T., GALBUSERA, P., et al. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimator. **Molecular Ecology**, v.10, p.1539-1549, 2001.

VAN HOOFT, W. F., GROEN, A. F., et al. Genetic structure of African buffalo herds based on variation at the mitochondrial D-loop and autosomal microsatellite loci: evidence for male-biased gene flow. **Conservation Genetics**, v.4, n.467-477, 2003.

WAPLES, R. S. Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. In: NIELSEN, J. L. (Ed.). **Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique Units in Population Conservation**. Bethesda: American Fisheries Society, 1995. p. 8-27

WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, n.6, p.1358-1370, 1984.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data** Sunderland: Sinauer Associates. 1996. p. 445

WHITE, G., POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, v.6, p.1195-1197, 1997.

WILSON, P. J., GREWAL, S., et al. Genetic variation and population structure of moose (*Alces alces*) at neutral and functional DNA loci. **Canadian Journal of Zoology**, v. 81, Jan, p. 670-683, 2003.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by f-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, p. 395-420, 1965.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, n.114, p.114-138, 1942.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago Press, v. 4. 1978. p. 580. Variability within and among populations.

WRIGHT, T. F., RODRIGUEZ, A. M., et al. Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona auropalliata*. **Molecular Ecology**, v.14, p.1197-1205, 2005.

ZUCCHI, M. I., BRONDANI, R. P. V., et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.449-457, 2003.

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

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

ORIENTADA: ISABELLA FERREIRA PENA

ORIENTADOR: PROF. DR. EVANGUEDES KALAPOTHAKIS

CO-ORIENTADORA: DR^A. CIBELE SOARES DE CASTRO

BELO HORIZONTE

Novembro - 2009

Isabella Ferreira Pena

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

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

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Co-orientadora: Dr^a. Cibeles Soares de Castro

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Charles Darwin

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

LISTA DE TABELAS

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

ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

ATP - Adenosina trifosfato

°C - Graus celsius

CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres

cm - Centímetro

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

g - Grama

h - Hora

HCl - Ácido clorídrico

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

IPTG - Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

kV - Quilovolt

LB - Meio Luria Bertani para cultura de bactérias

M - Molar

mA - Mili Ampere

mCi - Millicurie

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

min - Minuto

ml - Mililitro

mM - Milimolar

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ng - Nanograma

NaCl - Cloreto de sódio

P - Fósforo

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol - Picomol

PVC - Poli cloreto de vinila

psi - Libra por polegada ao quadrado

q.s.p. - Quantidade suficiente para

RFLP - Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição

RNA - Ácido ribonucleico

r.p.m - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

seg - Segundo

SSR - Sequência simples repetida

STR - Repetição de sequências em *tandem*

TAE - Tris, ácido acético, EDTA

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

TE - Tris, EDTA

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

U - Unidade de enzima

V - Volts

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

µg - Micrograma

µl - Microlitro

SUMÁRIO

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

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

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - O papagaio *Amazona aestiva*

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

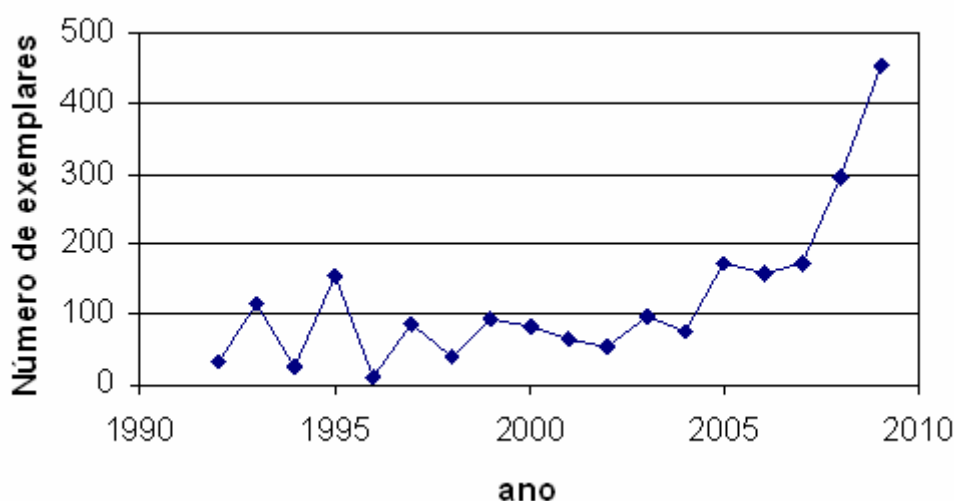


GRÁFICO 1 - Recebimento de *A. aestiva* pelo IBAMA de Belo Horizonte. Percebe-se um intenso crescimento no número de recolhimentos no período de 2002 até setembro de 2009, devido provavelmente ao aumento da fiscalização. Fonte: IBAMA (informação verbal)¹.

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

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

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

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

1.2 - Marcadores Moleculares

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

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

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

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

1.3 - Os Microssatélites

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

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

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

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

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

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

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

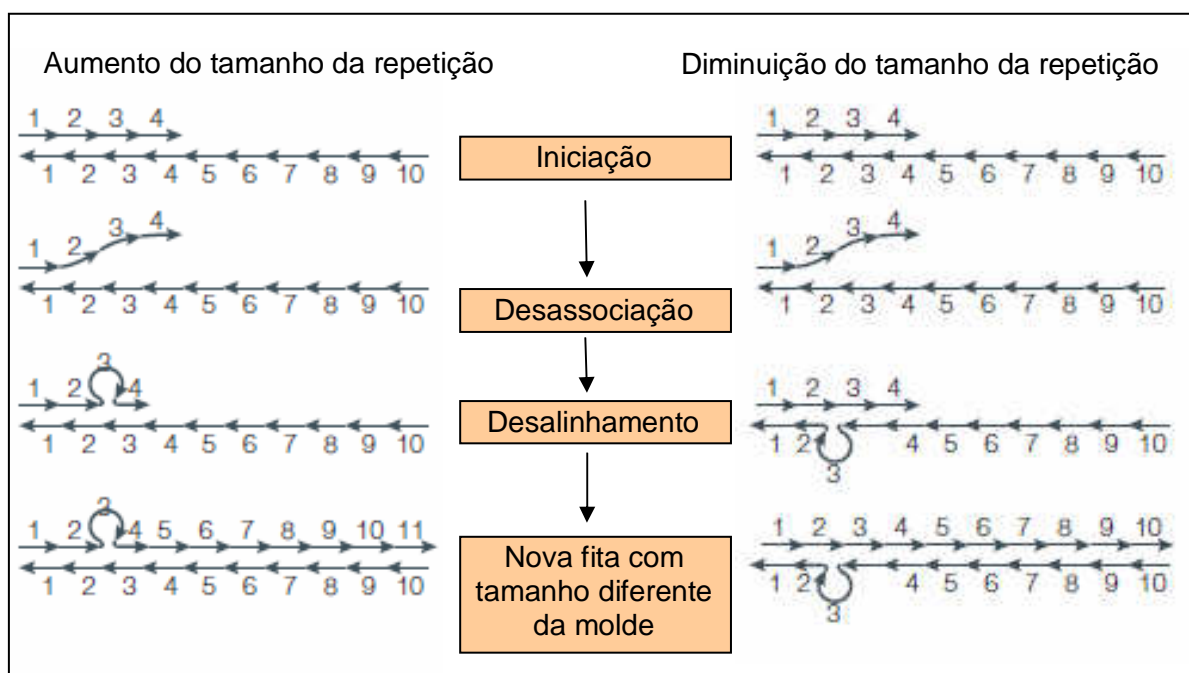


FIGURA 3 - Deslizamento da enzima DNA Polimerase durante a replicação do DNA.

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

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

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

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

1.4 - Estudos de microssatélites em psitacídeos

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

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

TABELA 1

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

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

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

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

1.5 - Justificativa

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

2 - OBJETIVO

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

2.1 - Objetivos específicos

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

3 - MATERIAIS

3.1 - Equipamentos

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

3.2 - Reagentes

3.2.1 - Antibióticos

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

Ampicilina

Concentração final de uso de 100 µg/ml.

Canamicina

Concentração final de uso de 100 µg/ml.

3.2.2 - Meios de cultura

LB Ágar

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

LB caldo

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

SOC

2% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glicose. Dissolver em água destilada e ajustar pH para 7,5. Autoclavar.

3.2.3 - Soluções

Gel de Agarose

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

Solução I para precipitação de plasmídeo por lise alcalina

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

solução II para Precipitação de plasmídeo por lise alcalina

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

solução III para Precipitação de plasmídeo por lise alcalina

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

Solução BLOTO

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

Solução salina

1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂. Diluir em água destilada.

SSC 6X

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

TAE

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

Tampão de desfosforilação

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

Tampão de fragmentação

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

Tampão de reparo

100 mM Tris-HCL, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM Ditioneitol, pH 7,9. Diluir em água destilada.

TE

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

TEN9

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

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

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

3.4 - Espécime de *Amazona aestiva*

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

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

Material utilizado para a construção do DNA recombinante.

DNA purification System (Promega)

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

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

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

5' labeling Kit (GE Healthcare)

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

3.6 - Vetor de clonagem

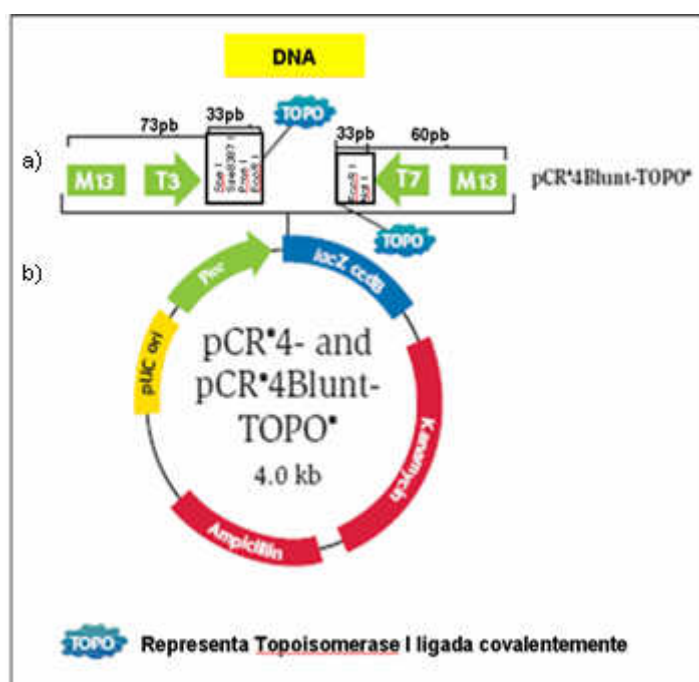


FIGURA 4 - Vetor *pCR4Blunt-TOPO* utilizado na biblioteca genômica de *A. aestiva*.

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

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

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

3.7 - Iniciadores M13 para PCR

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

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

4 - MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.5 - Construção do DNA recombinante

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

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

4.6 - Transformação de bactérias e seleção dos clones recombinantes

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

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

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

4.7 - Purificação dos plasmídeos recombinantes

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

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

4.8 - Identificação dos clones com microssatélites de interesse

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

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



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

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

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

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

TABELA 2

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

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

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

4.9 - Sequenciamento dos clones com microssatélites

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

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

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

4.10 - Análise do sequenciamento e desenho dos iniciadores

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

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

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

5 - RESULTADOS

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

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

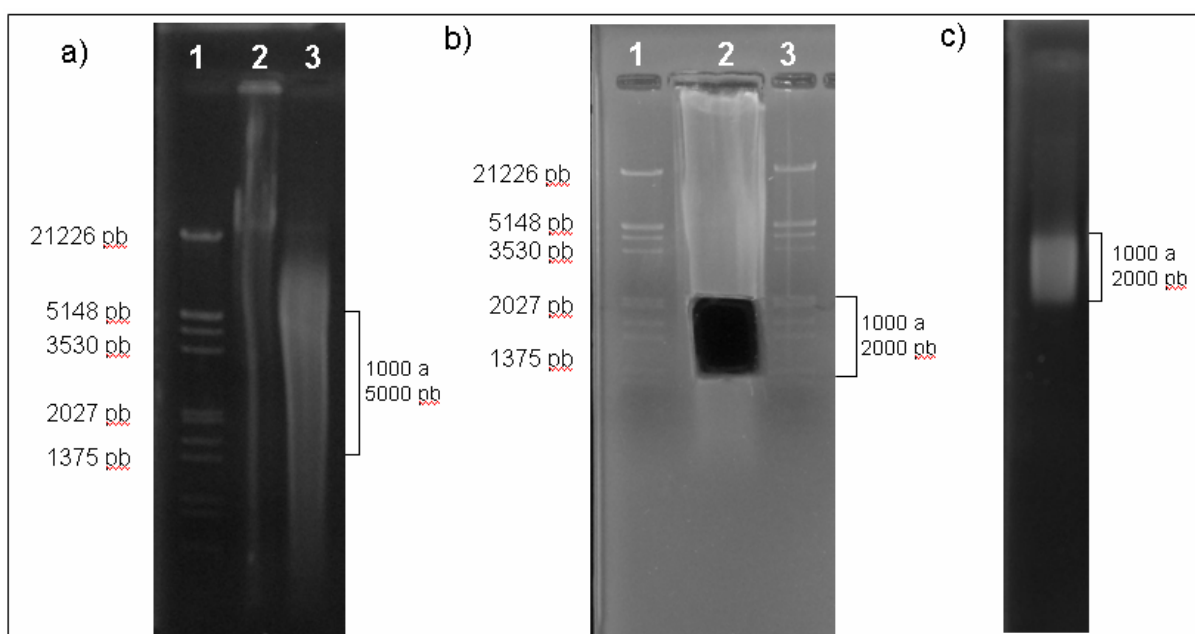


FIGURA 6 - Obtenção dos fragmentos de DNA genômico de *A. aestiva*.

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

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

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



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

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

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

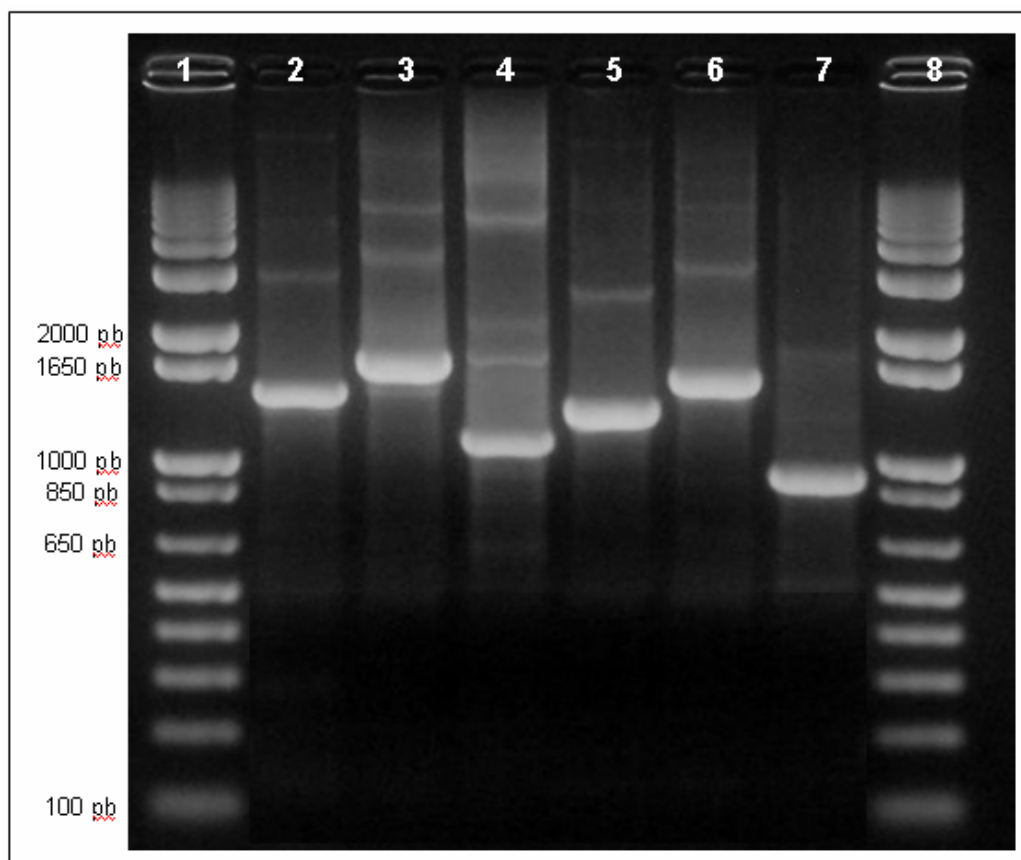


FIGURA 8 - Verificação do tamanho dos fragmentos da biblioteca genômica.

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

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

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

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

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

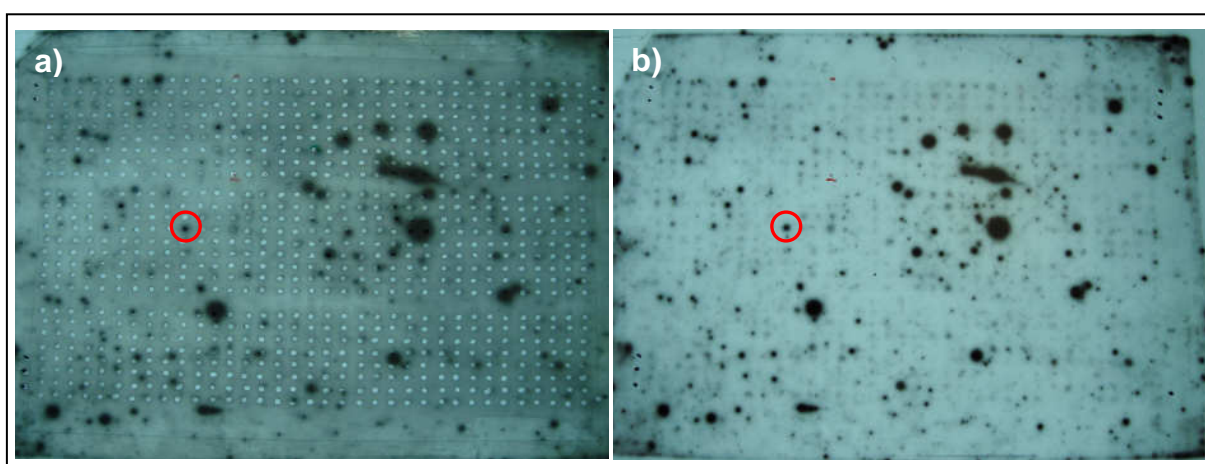


FIGURA 9 - Auto-radiografia de hibridização com sonda radioativa da membrana 2.

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

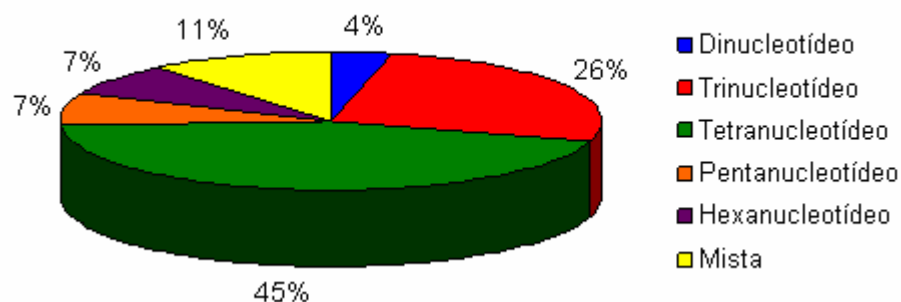


GRÁFICO 2 - Distribuição dos microssatélites quanto ao número de bases de suas repetições.

A maioria dos microssatélites encontrados eram de trinucleotídeos ou tetranucleotídeos.

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

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

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

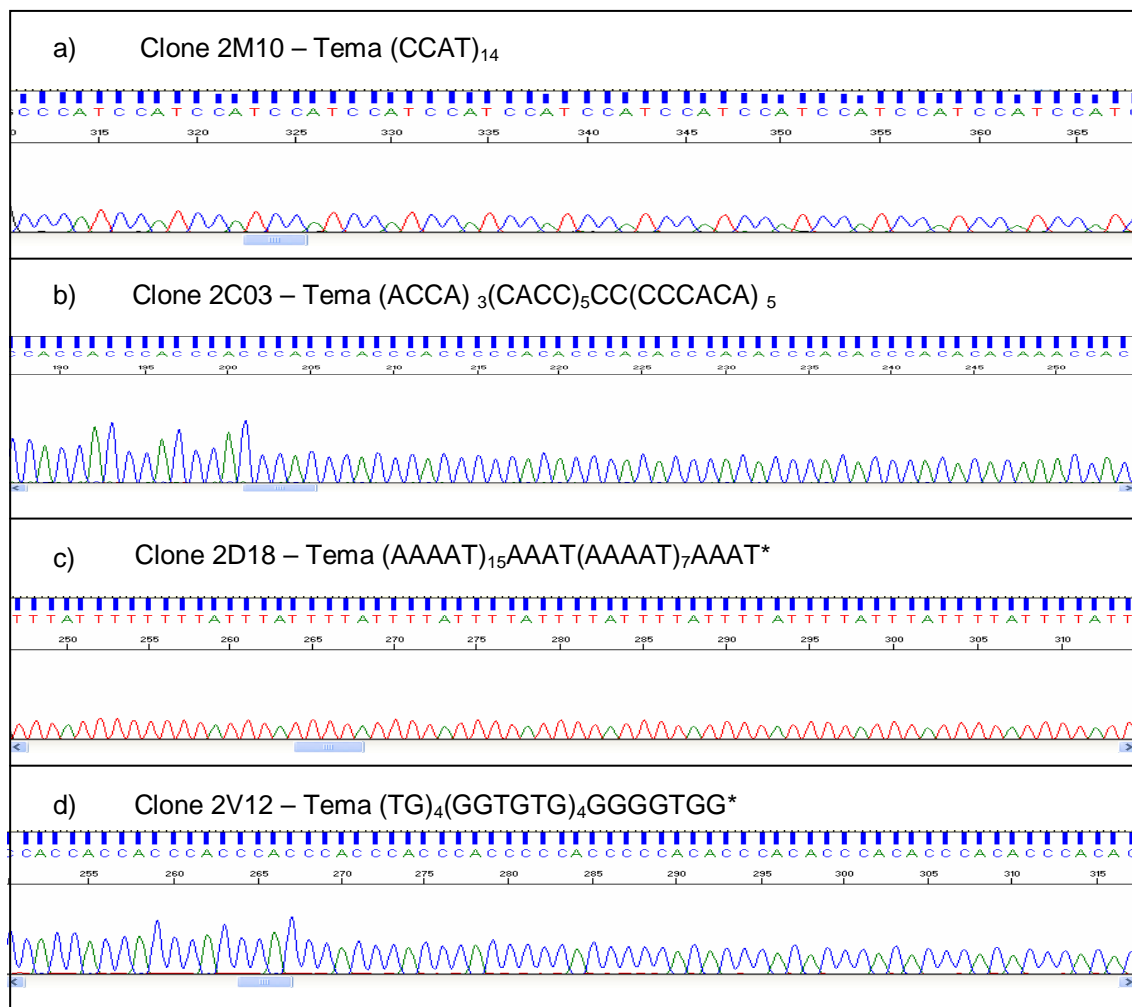


FIGURA 10 - Eletroferogramas mostrando trechos de microssatélites.

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

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

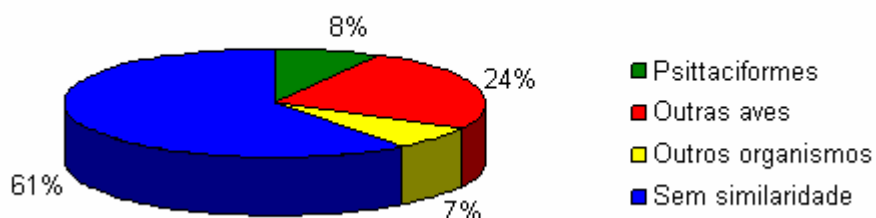


GRÁFICO 3 - Resultado de similaridade das seqüências no programa BLAST.

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

5.4 - Desenho de iniciadores para Nested PCR

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

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

TABELA 3

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

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

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

6 - DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.1 - Perspectivas

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

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

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

7 - CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MICROSATELLITE REPEATS FINDER. Desenvolvido pelo BioPHP. Localiza seqüências de bases repetitivas. Disponível em <www.biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php> Acesso em: jul. 2008

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROZEN, S; SKALETISKY, H. Primer 3. Disponível em: <www.broadinstitute.org/genome_software/other/primer3.html> Acesso em: ago 2009

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TABELA 4

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

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

Clone	Descrição da sequência com similaridade	Max score	E value	Max ident	Acesso
2M13	Gallus gallus BAC clone CH261-49N7 from chromosome unknown, complete sequence	65.8	5e-07	51/59 (86%)	XM_002192580.1
2T09	Gallus gallus suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), mRNA	320	8e-84	221/242 (91%)	NM_204600.1
2U09	Bordetella bronchiseptica strain RB50, complete genome; segment 10/16	494	3e-136	467/560 (83%)	BX640428.1
2X06	Eudypetes chrysocome CR1 gene for chicken repeat 1, partial sequence, clone: rock2-5	84.2	1e-12	53/57 (92%)	AB235777.1
3R26	Burkholderia phytofirmans PsJN chromosome 2, complete sequence	111	5e-21	285/388 (73%)	CP001053.1
3T14	Taeniopygia guttata chromosome UNK clone TGMCBa-21H12, complete sequence	99.0	4e-17	71/79 (89%)	AC188695.1
3T22	PREDICTED: Gallus gallus SET domain containing (lysine methyltransferase) 7 (SETD7), mRNA	346	2e-91	329/396 (83%)	XM_420409.2
3T25	PREDICTED: Taeniopygia guttata misc_RNA (LOC100217721), miscRNA	302	2e-78	204/222 (91%)	XR_054376.1
4B30	Psittacula alexandri eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 8 and partial cds	231	2e-57	170/191 (89%)	EU738680.1
4C18	Gallus gallus protein tyrosine phosphatase, receptor type, S (PTPRS), mRNA >gb L32780.1 CHKCRYP Gallus gallus protein-tyrosine phosphatase CRYPalph1 isoform	226	2e-55	164/184 (89%)	NM_205407.1
4Q15	Gallus gallus mRNA for hypothetical protein, clone 30a17	427	3e-116	307/344 (89%)	AJ851773.1
4U35	Chalcopsitta cardinalis pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase (PCBD1) gene, exons 2, 3 and partial cds	215	4e-52	162/184 (88%)	EU738434.1
4W16	Coturnix coturnix groucho-related protein 5 (Grg5) mRNA, partial cds	257	4e-65	187/211 (88%)	AY834285.1
5A01	Homo sapiens BAC clone RP11-735F20 from chromosome 8, complete sequence	52.8	0.001	28/28 (100%)	AC233992.5
5B13	Gallus gallus sal-like 1 (Drosophila) (SALL1), mRNA >gb AF288697.1 AF288697 Gallus gallus spalt 1 (SAL1) mRNA, complete cds	845	0.0	515/541 (95%)	NM_204707.1
5F09	PREDICTED: Taeniopygia guttata similar to RIKEN cDNA B230380D07 (LOC100231241), mRNA	628	6e-177	408/441 (92%)	XM_002195354.1
5G07	PREDICTED: Taeniopygia guttata topoisomerase (DNA) I (LOC100222949), mRNA	633	1e-107	248/262 (94%)	XM_002190004.1
5H30	Alisterus scapularis eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 9 and partial cds	244	5e-61	208/243 (85%)	EU738575.1
5S32	Gallus gallus 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	243	8e-61	200/232 (86%)	DQ018756.1
5V15	Psittacula alexandri eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2) gene, exons 5 through 8 and partial cds	204	1e-48	140/155 (90%)	EU738680.1
5W30	Cacatua sulphurea voucher NRM 20026154 beta fibrinogen gene, intron 7	187	1e-43	226/282 (80%)	DQ881947.1
5Y05	Gallus gallus finished cDNA, clone ChEST75k6	255	4e-64	181/201 (90%)	CR733233.1

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