

A biologia molecular como ferramenta no estudo da biodiversidade

Tania Tassinari Rieger*, Sérgio Roberto da Costa Campos e José Ferreira dos Santos.

*Laboratório de Genética e Citogenética Animal, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego s/n., CDU, CEP 50732-970, Recife, PE.*

**E-mail: rieger@ufpe.br*

Recebido em 15 de outubro de 2006

Resumo

Todos os organismos do planeta estão relacionados evolutivamente através do material genético de DNA. A descoberta da estrutura desta macromolécula, das enzimas de restrição e da Taq polimerase possibilitaram o desenvolvimento de várias tecnologias. Paralelamente aos métodos clássicos, estas tecnologias têm sido usadas na identificação, caracterização e comparações taxonômicas nos mais diversos grupos de organismos. Esta análise propiciou o conhecimento da extensão da biodiversidade do planeta e do grau de similaridade entre plantas, animais e o homem. O reconhecimento da biodiversidade e da composição genética única de cada espécie, torna maior e urgente a necessidade de conhecer para preservar.

Palavras Chave: marcadores moleculares, DNA.

The molecular biology as a tool in the study of biodiversity

Abstract

All organisms of our planet are evolutionarily related throughout its genetic material composed by DNA. The discovery of the structure of this macromolecule together with the restriction enzymes and Taq polymerase made possible the sprouting of a series of technologies. Parallel to the classic methods these technologies have been used in the taxonomic identification, genetic characterization, and comparisons of the most diverse organism groups. It has allowed knowing the extension of the planet biodiversity and also the degree of similarity between plants, animals and man. The knowledge of the uniqueness of each species genome makes urgent the necessity of know to preserve.

Key words: molecular markers, DNA.

Introdução

O fenômeno da Vida em nosso planeta apresenta duas principais características: a) genoma de ácido nucléico e b) diversidade. Quanto à diversidade biológica, estima-se em 1,9 milhão de espécies descritas de plantas, animais e microrganismos. Provavelmente o número total de espécies existentes é muito maior. Cada ambiente possui espécies diferentes, espécies têm populações geneticamente distintas e populações têm indivíduos geneticamente únicos (Kudryavtsev,

2006). Richard Dawkins resumiu de forma elegante as relações entre os seres vivos através de seus genomas ao afirmar que “A vida é um rio de DNA que corre ao longo do tempo, conectando todos os organismos passados, presentes e futuros” (Dawkins, 1996).

O termo “biodiversidade”, contração de diversidade biológica, foi introduzido na metade dos anos 80, pelos naturalistas que se inquietavam pela rápida destruição de ambientes naturais e de suas espécies, reclamando que a sociedade tomasse medidas efica-

zes para proteger este patrimônio natural. O termo foi popularizado na Conferência do Rio de Janeiro em 1992 e definido como “a variabilidade dos organismos vivos de qualquer origem, compreendendo, entre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e complexos ecológicos dos quais eles fazem parte. Isso compreende a diversidade no seio das espécies e entre as espécies, bem como aquela dos ecossistemas” (Léveque, 1999; Koziell & Swinglan, 2002). Resumindo, a biodiversidade está constituída pelo conjunto dos seres vivos, pelo seu material genético e pelos complexos ecológicos dos quais eles fazem parte. A importância da manutenção da biodiversidade deve-se à abrangência de suas implicações em três níveis: 1) econômico: fornecimento de alimentos, matéria prima para a indústria, medicamentos, turismo, etc. (Montanari & Bolzani, 2001); 2) ecológico: manutenção do processo evolutivo do mundo vivo, regulação dos ciclos físico-químicos da biosfera, reciclagem e decomposição natural de poluentes (Santandreu et al., 2002; Resende et al., 2002) e 3) ético: é dever moral de respeitar outras formas de vida (não eliminar deliberadamente, nem por negligência permitir sua extinção), garantindo desta forma a transmissão do patrimônio biológico para gerações futuras (Vianna et al., 2006).

A biodiversidade não é um simples catálogo de genes, espécies ou ambientes (por exemplo em Gustafsson, 2002, Gambi et al., 2003 e Santos et al., 2003). Ela deve ser percebida como um conjunto dinâmico e interativo entre diferentes níveis da hierarquia biológica. Segundo as teorias evolutivas estabelecidas no Século XX, somente a diversidade genética intra-específica pode garantir a adaptabilidade dos espécimes e das populações às modificações do meio ambiente. A história biológica da Terra teve início a cerca de 3,5 bilhões de anos com os organismos procariotos (sem membrana nuclear) e foi marcada por períodos de explosão de diversificação, como no Cambriano (período onde surgiram os principais grandes grupos de organismos modernos: anelídeos, moluscos, artrópodes, entre outros) e por grandes catástrofes de extinção, como no período Permiano, em que ocorreu a extinção de 80% dos gêneros de animais marinhos (Ridley, 2006). Entretanto, a diversidade genética de uma espécie evolui no tempo em função das modificações do ambiente, sempre sendo alimentada pelo surgimento de novas mutações e da

recombinação das previamente existentes (Albagli, 1998; Diniz, 2002).

Fontes de variação genética

Existem quatro formas de surgimento de variabilidade genética. A primeira é a **mutação gênica** que consiste na alteração de uma sequência de nucleotídeos da molécula de DNA. Estas mutações podem ser silenciosas (não apresentar efeito no fenótipo do organismo) ou se expressar de forma a ampliar ou reduzir a capacidade de sobrevivência do indivíduo. Um exemplo clássico é a mutação na posição seis da cadeia da beta globina da hemoglobina humana (HbA), responsável pelo transporte de oxigênio no sangue. A simples troca do aminoácido ácido glutâmico por valina origina uma proteína com propriedades distintas, denominada HbS. Esta mutação afeta a solubilidade e a cristalização da hemoglobina em condições de hipóxia, dando à hemácia a forma de foice. Indivíduos heterozigos para este novo alelo sobrevivem melhor em regiões de incidência do *Plasmodium falciparum*, que provoca malária fatal (entre seis meses e três anos), pois o protozoário não consegue se espalhar, enquanto os homozigotos apresentam anemia hemolítica severa (Moreira, 2000; Diniz & Guedes, 2003). Portanto, as mutações ampliam a variabilidade da população para um determinado loco gênico pela criação de uma nova sequência gênica.

A segunda forma de geração de diversidade é a **reprodução sexuada**, que possibilita a união de genomas distintos originários de dois genitores (masculino e feminino), em que cada um contribui com a metade do complemento cromossômico. Este tipo de reprodução só é possível graças à meiose, a forma de divisão celular onde o número cromossômico é dividido pela metade, permitindo a recomposição do número completo diplóide pela união dos gametas durante a fecundação. A meiose é tão importante e regulada que qualquer alteração pode acarretar infertilidade do organismo. Modificações na meiose podem também acarretar em especiação, como é o caso da autotetraploidia em anuros (Beçak & Kobashi, 2004). Além disso, durante a meiose ocorre o terceiro modo de surgimento de variabilidade genética, a **recombinação homóloga**, que é simplesmente a troca de segmentos entre os cromossomos homólogos

através da permuta (*crossing-over*, geralmente pelo menos um evento por cromossomo), gerando novos cromossomos com combinações de seqüências diferentes dos parentais. Assim, a reprodução sexuada amplia a variabilidade genética por juntar conjuntos gênicos de parentais distintos e a recombinação dos homólogos reorganiza os alelos nos cromossomos que sofreram permuta. Distúrbios ambientais como as queimadas acabam alterando a reprodução sexuada interferindo na variabilidade, dispersão, germinação das sementes e na sobrevivência de plântulas, jovens e adultos (Schmidt et al., 2005).

Finalmente, as **interações gênicas** são o resultado do efeito de genes (alélicos ou não) sobre os outros, alterando sua expressão. Classicamente, em termos de alelos temos as relações de dominância e semi-dominância, que mascaram os alelos recessivos por expressar somente o fenótipo dominante. Em termos de interações não-alélicas podemos citar a epistasia e a pleiotropia. Na pleiotropia uma mutação em um único gene pode afetar todo o fenótipo. A Fibrose Cística é um exemplo clássico, ocorrendo cerca de 600 alelos mutantes recessivos para o gene *CFTR* (Scotet et al., 2000; Cabello et al., 2003 e Santos et al., 2005) que codifica o canal de cloreto de sódio, com sintomas de doença pulmonar, deficiências nas enzimas pancreáticas e perda excessiva de sal (Erlandsen & Stevens, 1999). Outro tipo de interação gênica é a epistasia, quando um gene mascara ou cancela a atividade de outro. Um exemplo é o fenótipo Bombay, em que as pessoas portadoras de homozigose recessiva em um loco que permite a produção e ligação de açúcares às proteínas do grupo ABO serão sempre do tipo sanguíneo O, independentemente da herança do loco do tipo sanguíneo (Batissoco & Novaretti, 2003).

Modulação da variação genética

A variação genética gerada pelas mutações são colocadas em diferentes contextos gênicos, ou seja, em combinações gênicas diversas, através da combinação aleatória dos cromossomos maternos e paternos e da recombinação homóloga durante a meiose. São estas diferentes combinações dos genes que compõem os genótipos das espécies que estão sujeitas à ação da seleção natural. As combinações de alelos presentes nos diferentes genótipos da

população tornam os indivíduos fenotipicamente diferentes, modificando sua adaptabilidade às características e condições ambientais. Será sobre esta relação genótipo-fenótipo-ambiente que irá operar a seleção natural, em conjunto com os outros fatores evolutivos, a migração e a deriva genética ao acaso. A migração faz aumentar ou diminuir a frequência com que os alelos existem na população, fazendo variar a frequência com que as diferentes combinações gênicas são apresentadas à seleção natural. Já a deriva genética ao acaso pode interferir na ação da seleção da seleção natural por fazer variar ao acaso as frequências gênicas em populações pequenas, diminuindo a variabilidade genética (Ridley, 2006). Com a perda da variabilidade as espécies ficam desprotegidas frente às alterações ambientais, podendo entrar em risco de extinção, como é o caso do sagüi-de-serra-escuro na floresta Atlântica (Bernardo & Galetti, 2004).

Detecção e Caracterização da variabilidade genética

Polimorfismos protéicos e enzimáticos

Entre as décadas de 1960 e 1990, o estudo dos diferentes alelos através da separação por eletroforese de proteínas e enzimas foi um marco para estudos de genética e evolução. Os alelos que diferem em um aminoácido com carga elétrica distinta apresentam taxas de migração diferentes sob um campo elétrico. A aplicação desse método é restrita aos casos em que as diferentes formas sejam detectáveis por eletroforese, já que em cerca de 30% dos casos ocorre a substituição de um aminoácido por outro com a mesma propriedade, o que não resulta em diferenças detectáveis (Hunter & Markert, 1957; Markert & Moller, 1959). Outra restrição diz respeito ao método de detecção, pois os tecidos geralmente têm muitas proteínas diferentes. Em alguns casos a detecção é direta, como no caso da hemoglobina ou do citocromo, e em outros a detecção é indireta, através de colorações específicas que empregam, por exemplo, corantes em associação com anticorpos específicos. De maneira geral, buscava-se avaliar mais de 20 locos em mais de 200 indivíduos das mais diversas espécies, incluindo o homem (Lewontin & Hubby, 1966; Salzano et al., 1988; Rieger et al., 1995; Hoshizaki, 1997). Com os resultados obtidos eram avaliados o percentual de

locos polimórficos (P), o grau de heterozigozidade média (H) e as relações de parentesco, pela aplicação de medidas de distância genética e a construção de árvores filogenéticas. Estes estudos resultaram numa prolífera produção de dados que foram pioneiros na caracterização da diversidade genética das populações e no estabelecimento de relações filogenéticas, utilizando informações genéticas em conjunto com a morfologia clássica. Embora fora de moda, os polimorfismos enzimáticos continuam sendo usados tanto na sua abordagem clássica em grupos e espécies pouco estudados (Lopes et al., 2002; Reis et al., 2002) como para diferenciar rapidamente espécies crípticas (Garcia et al., 2006), desvendar as relações de parentesco entre tipos vegetais (Oliveira-Collet et al., 2005; Enríquez et al., 2005) e distinguir organismos transgênicos dos convencionais (Messeguer, 2003; Chen et al., 2005).

Polimorfismos de DNA

Tendo por base as descobertas sobre a estrutura de DNA por Watson & Crick (1953), o advento da tecnologia do DNA recombinante no final da década de 1970 e a amplificação de DNA por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em meados da década de 1980, existe agora uma série de métodos que permitem a caracterização de polimorfismos moleculares observados diretamente no DNA. Em termos genéticos a novidade mais importante é que os marcadores obtidos com tecnologia de DNA são mais polimórficos que os marcadores protéicos, uma vez que a variabilidade investigada está nas bases nitrogenadas e não nos aminoácidos codificados pelas trincas. Com isso, o potencial do uso de marcadores de DNA é virtualmente ilimitado. Além disso, a combinação de métodos como a citogenética clássica com técnicas de biologia molecular, permitiram o desenvolvimento de novas possibilidades de geração de marcadores para estudo de diversidade e comparação de espécies e outros grupos taxonômicos, como a hibridização *in situ* (Segarra et al., 1995; Campos et al., 2006).

Seqüenciamento de DNA

A principal técnica para estudo de DNA é o seqüenciamento de nucleotídeos. O método de seqüenciamento por terminal didesoxi, concebida por Sanger et al. (1977), é o mais utilizado. Em seus

primórdios era possível seqüenciar apenas alguns nucleotídeos por ano, mas na década de 1990 o seqüenciamento, agora acoplado à técnica de PCR, foi automatizado e milhões de bases podem ser seqüenciadas no mesmo tempo. A automatização tornou possível o seqüenciamento, em poucos anos, de genomas inteiros constituídos de alguns megabases presentes em organismos eucariontes. O sucesso do seqüenciamento dos genomas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Oliver, 1996), da mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) e da planta *Arabidopsis thaliana* (Theologis et al., 2000), fizeram explodir o número de genomas eucariontes em processo de seqüenciamento, culminando com o genoma humano em 2001 (Pereira, 2001), no entanto os custos do seqüenciamento completo de um genoma eucarionte são muito altos, exigindo pessoal treinado e grande investimento em equipamentos. Por este motivo continuam a ser realizados com maior frequência, os seqüenciamentos de alguns genes de interesse mais imediato, como os genes de rRNA (Spicer & Bell, 2002; De Ley et al., 2005) e *HOX* (Aboobaker & Blaxter, 2003; Wagner et al., 2003), muito utilizados para a construção de árvores filogenéticas. Outra alternativa, para estudos de diversidade e relações evolutivas têm sido o seqüenciamento de DNA mitocondrial (Iñiguez et al., 2003; Nagaraja et al., 2004; Campos-Macías et al., 2006). A análise da vastidão dos dados de seqüenciamento, incluindo a comparação das seqüências de diversos organismos, originou um novo campo interdisciplinar de pesquisa, a bioinformática, envolvendo técnicas e ferramentas da biologia e da informática e profissionais de ambas as especialidades (Bikandi et al., 2004).

Marcadores de DNA

RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

As variações nas seqüências de nucleotídeos do DNA de dois ou mais organismos podem ser detectadas como alterações de tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição (ER), que são enzimas capazes de reconhecer uma pequena seqüência de nucleotídeos e cortar o DNA neste sítio. Quando o DNA de organismos, portando estas diferenças, forem

expostos a uma enzima de restrição, serão gerados fragmentos de diferentes tamanhos que podem ser separados e eventualmente, clonados e identificados (mapeados). Tais fragmentos polimórficos são denominados de **RFLPs** (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), em português “polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição”, Botstein et al., 1980). A obtenção de RFLPs envolve três etapas: a) extração e purificação do DNA de dois organismos a serem comparados; b) digestão do DNA por ER; e c) análise por eletroforese dos fragmentos gerados. Porém, como os organismos podem conter bilhões de pares de bases (pb), a etapa de digestão do DNA com apenas uma ER, produz milhares de fragmentos que variam em comprimento de acordo com a distribuição dos sítios de clivagem da enzima. Esta quantidade impossibilita a análise de todos os fragmentos de uma só vez. Portanto, é obrigatória a separação dos fragmentos da mistura por eletroforese em gel de agarose, em que os menores migram mais rapidamente. Desta maneira, os fragmentos de DNA de dois (ou mais) organismos, gerados pela ER, são separados lado a lado no mesmo gel, permitindo a comparação do tamanho individual dos fragmentos. Adicionalmente, fragmentos de interesse especial poderão ser identificados, após transferência do DNA para um suporte sólido e hibridização com uma sonda de sequência conhecida (Ferreira & Gratapaglia, 1995).

Os fragmentos de diferentes tamanhos podem ser denominados de alelos, por apresentarem herança mendeliana. A principal característica da técnica do RFLP é a sua habilidade em detectar tais diferenças. Os RFLPs mais informativos são aqueles cuja sequência ocorre somente uma vez no genoma, denominados de cópia única. Desta forma, os RFLPs do DNA nuclear são específicos e exibem codominância, ou seja, é possível distinguir os homozigotos entre si e estes do heterozigoto. Os RFLPs apresentam alta estabilidade, ou seja, o DNA a ser analisado pode ser extraído de qualquer parte do organismo, e a pleiotropia e a epistasia, que afetam a resolução dos marcadores morfológicos, não têm efeito sobre eles. Outra característica fundamental é que a herdabilidade, ou probabilidade de herança, deste tipo de marcador é virtualmente 1, possibilitando a realização de seleção indireta de uma característica associada. Por sua segura informação genotípica e ocorrência em grande número, estes marcadores

possibilitam o desenvolvimento de mapas genéticos de ligação muito densos. Isto torna os RFLPs muito úteis na caracterização genética de germoplasma, na identificação de variedades, no controle de qualidade da produção de sementes híbridas, na caracterização genética de populações naturais, no monitoramento de retrocruzamentos e como auxílio na identificação e clonagem de genes (Abolhassani et al., 2006; Arabatzis et al., 2006; El Tassa & Duarte, 2006).

Marcadores baseados em PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi concebida no início da década de 80, mas foi utilizada de forma rotineira somente a partir da década de 90 (Fields, 2001). Esta metodologia tem a capacidade de amplificar um fragmento de DNA de até 4.000pb fragmentos maiores são amplificados desde que empregadas condições específicas. A técnica de PCR consiste em uma sequência alternada de três passos: 1) separação das fitas do DNA molde por desnaturação; 2) o anelamento dos iniciadores (ou *primers*) específicos às suas sequências complementares no DNA desnaturado; 3) e finalmente a extensão das fitas de DNA a partir dos iniciadores (Vosberg, 1989; Cousillas et al., 1999). A amplificação de DNA por PCR é feita em máquinas programáveis, os termocicladores, capazes de modificar a temperatura rapidamente de acordo com o tempo necessário para cada etapa da reação. Para amplificar o fragmento de DNA de forma específica, são utilizados iniciadores, que são oligonucleotídeos de aproximadamente 20 nucleotídeos, para anelar de forma precisa nas extremidades das fitas complementares do DNA em sentidos antiparalelos. Os iniciadores são então estendidos pela DNA polimerase, que copia a sequência da fita complementar, produzindo novas fitas de DNA. Os iniciadores são necessários não somente para delimitar o fragmento a ser amplificado, mas também porque a DNA polimerase não consegue iniciar uma nova cadeia de DNA, mas somente estendê-la. Esta característica confere especificidade à amplificação do fragmento de DNA, evitando que outras sequências sejam também amplificadas. Como as DNA polimerases comuns não resistem à variação de temperatura, é utilizada a Taq DNA polimerase, produzida pela bactéria *Thermus aquaticus*. Esta bactéria é adaptada a viver normalmente na água

fervente de determinadas formações geológicas, por isso sua DNA polimerase é altamente resistente à temperatura (Biswas et al., 1999). Finalmente os produtos da PCR são visualizados num gel de agarose após eletroforese. Esta visualização é possível com o auxílio do brometo de etídio, que quando presente no gel se interpõe entre as duas fitas do DNA e se torna avermelhado na presença de luz ultravioleta (Bergeron & Ke, 2001).

RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

Ainda na década de 1980, com base na PCR foi desenvolvido um novo tipo de marcador molecular denominado **RAPDs** (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*, ou DNA polimórfico amplificado ao acaso; Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Utilizando pequenos iniciadores, de seqüências conhecidas, mas sem especificidade de anelamento, podem ser amplificadas na mesma reação de PCR regiões com seqüências similares distribuídas aleatoriamente no genoma. O pequeno tamanho dos iniciadores (variando em torno de 10 nucleotídeos), torna possível seu anelamento e amplificação de várias regiões complementares no genoma simultaneamente. Os produtos resultantes da amplificação podem ser visualizados como bandas em géis de agarose ou poliacrilamida, após a eletroforese. Diferenças no nível de DNA são inferidas pela presença ou ausência de um determinado fragmento amplificado, observado como banda no gel. Uma diferença entre dois organismos que ocorra na região de anelamento do iniciador é identificada pela ausência da referida banda em uma delas e presença da banda na outra. Em relação aos RFLPs, os RAPDs são mais baratos e requerem menor tempo de trabalho. Devido a isso, nos últimos anos foram desenvolvidos mapas genéticos de vários organismos com marcadores RAPD, combinados ou não com RFLPs (Borges et al., 2000; Teixeira et al., 2004). Em plantas, os RAPDs têm facilitado a realização de estudos de melhoramento, até então considerados inexecutáveis com as técnicas tradicionais (Herzberg et al., 2002; Faleiro et al., 2003; Zimback et al., 2003; Gauer & Cavalli-Molina, 2000). Também para o estudo de microrganismos a técnica de RAPD tem sido largamente utilizada para detectar variabilidade genética (Brasileiro et

al., 2004) entretanto, algumas restrições podem ser feitas à utilização do RAPD, principalmente pelo fato de ser um marcador dominante, ou seja, que não permite separar os indivíduos homocigotos dos heterocigotos, uma vez que cada heterocigoto produz a mesma banda que o respectivo homocigoto.

AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Os polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (**AFLPs**, *Amplified Fragments Length Polymorphism*), são resultantes do uso combinado de enzimas de restrição e da PCR (Mueller & Wolfenberger, 1999; Bikandi et al., 2004). Suas principais características são a alta especificidade, resolução e poder de amostragem. Após a digestão do DNA genômico são obtidos vários fragmentos de diversos tamanhos e durante a amplificação por PCR são adicionados adaptadores para enzimas de restrição, cujos fragmentos podem ser amplificados e analisados em um único gel. Apesar da alta reprodutibilidade, os marcadores AFLPs são dominantes, não distinguindo os heterocigotos de cada um dos homocigotos, além desta tecnologia ser protegida por patente (Zabeau, 1993), condições que restringem o seu uso. Mesmo assim, esta tecnologia tem sido usada principalmente em plantas (Xu et al., 2000; Coulibaly et al., 2002) e microrganismos (Gzyl et al., 2005) em análises de diversidade genética e grau de parentesco.

Minissatélites (VNTR) e Microssatélites (STR)

O DNA genômico apresenta regiões de cópia única e outras com níveis variáveis de repetições. Estas repetições podem ser longas (satélites), curtas (minissatélites) ou muito curtas (microssatélites). Os minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*, ou Número Variável de Repetições em Tandem, em português) são regiões dispersas no genoma que contêm um número variável de seqüências de nucleotídeos repetidas e enfileiradas lado a lado (Tandem) que possuem um núcleo comum de 10 a 15 pares de bases (Jeffrey et al., 1985; Hanssen et al., 1999). As VNTR podem ser analisadas através de RFLP ou PCR. Muitos dos minissatélites são altamente polimórficos, produzindo um grande número

de bandas. Estão espalhados por todo o genoma e apresentam um número variável de repetições em diferentes indivíduos em relação a uma mesma região cromossômica (loco). Por serem indivíduos-específicos, os minissatélites proporcionam um conjunto de marcadores genéticos denominados de “impressão digital de DNA” capazes de discriminar espécies e tipos dentro de grupos complexos (Skuce et al., 2002; Ruas et al., 2003; Brasileiro et al., 2004). Para a obtenção do padrão de bandas utiliza-se o mesmo procedimento utilizado para o RFLP, com exceção de que a sonda contém repetições conhecidas de sequência.

Entre as diversas seqüências repetidas em Tandem, algumas são simples, formadas por um ou poucos nucleotídeos. Tais repetições curtas em Tandem (STR, *Short Tandem Repeats*) são denominadas de microssatélites. Os microssatélites, também chamados SSRP (*Simple Sequence Repeat Polymorphisms*) ou STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*), são seqüências repetidas de um, dois, três ou quatro nucleotídeos e que estão espalhadas pelo genoma de um indivíduo. São altamente polimórficos em plantas, animais e microorganismos. Assim, cada região genômica que contenha um determinado número de repetições de uma destas seqüências constitui-se num loco genético, altamente variável entre indivíduos e multialélico (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Comparativamente aos RFLPs, os microssatélites proporcionam 3 a 4 vezes mais polimorfismo ou informação. Entretanto, para o uso rotineiro dos microssatélites, há a necessidade de primeiro amplificar uma região por PCR, determinar a seqüência de nucleotídeos e em seguida, sintetizar os iniciadores específicos para cada loco. Uma vez feito isto, o loco marcador pode ser utilizado indefinidamente na espécie. O mapeamento genético e a caracterização de variedades, para fins de proteção e de conservação de várias espécies, está sendo feito com o uso dos marcadores microssatélites (Garcia et al., 2004; Vianna et al., 2006; Zucoloto et al., 2006). Outro uso é o estudo e caracterização de populações humanas (Kayser et al., 2003; Excoffier & Hamilton, 2003; Dellalibera et al., 2004) e de outros organismos (Magiafoglou & Hoffmann, 2003; Brasileiro et al., 2004).

Construção de mapas genéticos

O grande volume de marcadores genéticos disponíveis possibilita o desenvolvimento de densos

mapas de ligação, uma ferramenta tanto para pesquisa básica quanto aplicada. Os marcadores de DNA segregam em proporções mendelianas e não interferem na segregação de outros genes. Quando em grande quantidade segregando num cruzamento, é possível a construção de um mapa genético de ligação, cuja densidade depende da quantidade de marcadores. Devido ao interesse médico ou econômico, algumas espécies de mamíferos também são exemplos de espécies que têm mapas gênicos em construção, como é o caso do homem (Schuler et al., 1996) e alguns primatas (De Pontbriand et al., 2002), de bovinos (El Nahas et al., 2001; Antoniou et al., 2002), do cavalo (Caetano et al., 1999), do cão (Dutra et al., 1996), do porco (Cirera et al., 2003) e do gato (O'Brien et al., 1997), além de outros. Entre as plantas, algumas espécies também têm mapas genéticos prontos ou em andamento, como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*, além do milho e outros cereais (Fourmann et al. 2002). Em insetos, a técnica de hibridização *in situ* tem sido aplicada especialmente em cromossomos politênicos, como nos gêneros *Drosophila* (Bonorino et al., 1993; Ruiz et al., 1997), *Rhagoletis* (Procunier & Smith, 1993), *Aedes* (Brown & Knudson, 1997) e *Anopheles* (Benedict et al., 1993), para localização de genes das famílias das proteínas de resposta ao choque térmico, genes ribossomais 18S e 5S e genes de amilase e esterase. Esta metodologia tem se mostrado útil também em estudos evolutivos, que comparam cromossomos politênicos entre *D. melanogaster* e outras espécies (Segarra et al., 1995; Ranz et al., 1997; Campos et al., 2006). A construção destes mapas utilizou diferentes técnicas, incluindo mapeamento paquitênico, hibridização *in situ* e análise de reassociação de DNA.

Considerações Finais

Toda esta trajetória dos marcadores genéticos na caracterização e identificação da diversidade biológica e estabelecimento de relações evolutivas iniciou-se com os trabalhos de Mendel e Watson & Crick. Mendel estabeleceu o princípio da hereditariedade e Watson e Crick revelaram a estrutura do DNA e o princípio da complementariedade das bases A-T e G-C, fundamental para o desenvolvimento dos marcadores de DNA e da tecnologia do DNA recombinante. Agora somos capazes de avaliar o grau de biodiversidade genética das espécies

e populações e usar esta informação para sua conservação.

Como resultado geral da aplicação destas tecnologias observamos um grau inesperado de similaridade entre plantas, animais, microorganismos e o homem. Somos capazes também de alterar genomas e, portanto, as espécies existentes. O homem é a única espécie do planeta que pode alterar drasticamente o ambiente e as outras espécies, cabendo a nós, portanto, a utilização responsável de todas estas ferramentas em prol da manutenção da biodiversidade para as gerações futuras.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. André Esteves, organizador na UFPE do Seminário “Gestão Sustentável da Biodiversidade: Desafio do Milênio”, de onde partiu a iniciativa para a redação deste artigo.

Referências bibliográficas

- ABOLHASSANI, N.; ZADEH, M.S.; JAVADI, G.; SADEGHI, M.; RAFATI, Z.; RAFATI, H. Comparative molecular PCR-RFLP study of native *Herpes Simplex Virus* Type 1 (HSV-1) with KOS strain. **Iranian Biomedical Journal**, V.10, n.3, p.157-161, 2006.
- ABOUBAKER, A.; BLAXTER, M. Hox gene evolution in nematodes: novelty conserved. **Current Opinion in Genetics & Development**, V.13, p.593-598, 2003.
- ADAMS, M.D.; CELNIKER, S.E.; HOLT, R.A.; EVANS, C.A.; GOCCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.G.; SCHERER, S.E.; LI, P.W.; HOSKINS, R.A.; GALLE, R.F.; GEORGE, R.A.; LEWIS, S.E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, V.287, p.2185-2195, 2000.
- ALBAGLI, S. Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. *Ciência da Informação*, Brasília, V.27, n.1, p.7-10, 1998.
- ANTONIOU, E.; GALLAGHER, D.; TAYLOR, J.; DAVIS, S.; WOMACK, J.; GROSZ, M. A comparative map of bovine chromosome 25 with human chromosomes 7 and 16. **Cytogenetic Genome Research**, V.97, p.128-132, 2002.
- ARABATZIS, M.; XYLOURI, E.; FRANGIADAKI, I.; TZIMOGIANNI, A.; MILIONI, A.; ARSENIS, G.; VELEGRAKI, A. Rapid detection of *Arthroderma vanbreuseghemii* in rabbit skin specimens by PCR-RFLP. **Veterinary Dermatology**, V.17, p.5-322, 2006.
- BATISSOCO, A.C.; NOVARETTI, M.C.Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, V.25, n.1, p.47-58, 2003.
- BEÇAK, M.L.; KOBASHI, L.S. Evolution by polyploidy and gene regulation in Anura. **Genetics and Molecular Research**, V.3, n.2, p.195-212, 2004.
- BENEDICT, M.Q.; COCKBURN, A.F.; SEAWRIGHT, J.A. The *Hsp70* heat-shock gene family of the mosquito *Anopheles albimanus*. **Insect Molecular Biology**, V.2, p.93-102, 1993.
- BERGERON, M.G.; KE, D. New DNA-based PCR approaches for rapid real-time detection and prevention of group B streptococcal infections in newborns and pregnant women. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, V.1, p.1-14, 2001.
- BERNARDO, C. S. S.; GALETTI, M. Densidade e tamanho populacional de primatas em um fragmento florestal no Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, V.21, n.4, p.827-832, 2004.
- BIKANDI, J.; MILLÁN, R.S.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. **Bioinformatics**, V.20, n.5, p.798-799, 2004.
- BISWAS, I.; BAN, C.; FLEMING, K.J.; QIN, J.; LARY, J.W.; YPHANTIS, D.A.; YANG, W.; HSIEH, P. Oligomerization of a MutS mismatch repair protein from *Thermus aquaticus*. **The Journal of Biological**

Chemistry, V.274, n.33, p.23673–23678, 1999.

BONORINO, C.B.C.; PEREIRA, M.; ALONSO, C.E.V.; VALENTE, V.L.S.; ABDELHAY, E. *In situ* mapping of the *Hsp70* locus in seven species of the *willistoni* group of *Drosophila*. **Brazilian Journal of Genetics**, V.16, p.561-571, 1993.

BORGES, E.C.; ROMANHA, A. J.; DIOTAIUTI, L. Uso do *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. **Cadernos de Saúde Pública**, V.16, n.2, p.97-100, 2000.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, V.32, p.314-331, 1980.

BRASILEIRO, B.T.R.V.; COIMBRA, M.R.M.; MORAIS JR.,M.A.; OLIVEIRA, N.T. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-Fingerprinting based on PCR markers. **Brazilian Journal of Microbioly**, V.35, p.205-210, 2004.

BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L. FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. **Insect Molecular Biology**, V.6, p.197-202, 1997.

CABELLO, G.M.K.; CABELLO, P.H.; ROIG, S.R.S.; FONSECA, A.; CARVALHO, E.C.D.; OCTAVIO FERNANDES, O. Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação $\Delta F508$. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, V.39, n.1, p.15- 20, 2003.

CAETANO, A.R.; SHIUE, Y.L; LYONS, L.A.; O'BRIEN, S.J.; LAUGHLIN, T.F.; BOWLING, A.T.; MURRAY, J.D. A comparative gene map of the horse (*Equus caballus*). **Genome Research**, V.9, p.1239-1249, 1999.

CAMPOS-MACÍAS, P.; ARENAS, R.; VEGA-ME-MIJE, M.; KAWASAKI, M. Sporothrix schenckii type 3D (mtDNA-RFLP): Report of an osteoarticular

case. **The Journal of Dermatology**, V.33, p.295-299, 2006.

CAMPOS, S.R.C.; RIEGER, T.T.; SANTOS, J.F. Homology of polytene elements between *Drosophila* and *Zaprionus* determined by *in situ* hybridization in *Z. indianus*. **Genetics and Molecular Research**, (submitted), 2006.

CHEN, S.; HAJIREZAEI, M.; BÖRNKE, F. Differential expression of Sucrose-Phosphate Synthase isoenzymes in Tobacco reflects their functional specialization during Dark-Governed starch mobilization in source leaves. **Plant Physiology**, V.139, p.1163–1174, 2005.

CIRERA, S.; JORGENSEN, C.B.; SAWERA, M.; RAUDSEPP, T.; CHOWDHARY, B.P.; FREDHOLM, M. Comparative mapping in the pig: localization of 214 expressed sequence tags. **Mammalian Genome**, V.14, p.405-426, 2003.

COULIBALY, S.; PASQUET, R.S.; PAPA, R.; GEPTS, P. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical and Applied Genetics**, V.104, p.358–366, 2002.

COUSILLAS, A. L.; VALIENTE, A.; I. EZPELETA, I.; F. GARCÍA-BRAGADO, F. Valor de la reacción en cadena de la polimerasa en el estudio de los síndromes linfoproliferativos. **Anales Sis San Navarra**, V.22, n.3, p.33-40, 1999.

DAWKINS, R. **O rio que saía do Éden. Uma visão darwiniana da vida**, Ed Rocco, São Paulo, 1996.

DE LEY, P.; DE LEY, I.T.; MORRIS, K.; ABEBE, E.; MUNDO, M.; YODER, M.; HERAS, J.; WAUMANN, D.; ROCHA-OLIVARES, A.; BURR, J.; BALDWIN, J.G.; THOMAS, W.K. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Science**, V.360, p.1945–1958, 2005.

DE PONTBRIAND, A.; WANG, X.P.; CAVALOC, Y.; MATTEI, M.G.; GALIBERT, F. Synteny comparison between apes and human using fine-mapping of the genome. **Genomics**, V.80, p.395-401, 2002.

DELLALIBERA, E.; HAVRO, M.L.B.; SOUZA, M.; KAJIHARA, K.; MAURICIO-DA-SILVA, L.; SILVA, R.S. Genetic analysis of 13 STR loci in the population from the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Forensic Science International**, V.146, p.57-59, 2004.

DINIZ, D.; GUEDES, C. Anemia falciforme: um problema nosso. Uma abordagem bioética sobre a nova genética. **Caderno de Saúde Pública**, V.19, n.6, p.1761-1770, 2003.

DINIZ, E.M. Os resultados da *RIO +10*. **Revista do Departamento de Geografia**, V.15, p.31-35, 2002.

DUTRA, A.S.; MIGNOT, E.; PUCK, J.M. Gene localization and syntenic mapping by FISH in the dog. **Cytogenetic and Cell Genetic**, V.74, p.113-117, 1996.

EL NAHAS, S.M.; DE HONDT, H.A.; WOMACK, J.E. Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. **Journal of Heredity**, V.92, p.221-225, 2001.

EL TASSA, S.O.M.; DUARTE, V. Identificação de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* através de PCR RFLP do gene *recA*. **Fitopatologia Brasileira**, V.31, p.23-28, 2006.

ENRÍQUEZ, G.R.; VALLEJO, P.R.; GONZÁLEZ, J.S.; YAMAKAKE, T.A.K. Variación isoenzimática en poblaciones de Teocintle. **Revista Fitotecnia Mexicana**, V.28, n.2, p.105-113, 2005.

ERLANDSEN, H.; STEVENS, R.C. The structural basis of phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, V.68, p.103-125, 1999.

EXCOFFIER, L.; HAMILTON, G. Comment on "Genetic Structure of Human Populations". **Science**,

V.300, p.1877b, 2003.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X., GOOD-GOD, P.I., BROMMON-SHENKEL, S.H., MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, V.28, p.59-66, 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, EMBRAPA, 220p. 1995.

FIELDS, S. The interplay of biology and technology. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, V.98, n.18, p.10051-10054, 2001.

FOURMANN, M.; BARRET, P.; FROGER, N.; BARON, C.; CHARLOT, F.; DELOURME, R.; BRUNEL, D. From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus*: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. **Theoretical and Applied Genetics**, V.105, p.1196-1206, 2002.

GAMBI, C.; VANREUSELB, A.; DANOVAROA, R. Biodiversity of nematode assemblages from deep-sea sediments of the Atacama Slope and Trench (South Pacific Ocean). Deep-sea Research part I: Oceanographic Research Papers, V. 50, n.1, p. 103-117. 2003.

GARCIA, A.A.F.; BENCHIMO, L.L.; BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; SOUZA, C.L.; SOUZA, A.P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Biology**, V.27, n.4, p.579-588, 2004.

GARCIA, A.C.L.; ROHDE, C.; AUDINO, G.F.; VALENTE, V.L.S.; VALIATI, V.H. Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through the electrophoretic mobility of acid phosphatase-1. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, V.44, n.3,

p.212-216, 2006.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of mate using RAPD markers. **Heredity**, V.84, p.47–656, 2000.

GUSTAFSSON, L. Presence and abundance of red-listed plant species in Swedish forests. **Conservation Biology**, V.16, n.2, p.377-388, 2002.

GZYL, A.; AUGUSTYNOWICZ, E.; MOSIEJ, E.; ZAWADKA, M.; GNIADEK, G.; NOWACZEK, A.; SLUSARCZYK, J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) versus randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) as new tools for inter- and intra-species differentiation within *Bordetella*. **Journal of Medical Microbiology**, V.54, p.333–346, 2005.

HANSEN, M.M.; TAGGART, J.B.; MELDRUP, D. Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite loci. **Journal of Fish Biology**, V.55, p.1-183, 1999.

HERZBERG, M.; FISCHER, R.; TITZE, A. Conflicting results obtained by RAPD-PCR and large-subunit rDNA sequences in determining and comparing yeast strains isolated from flowers: a comparison of two methods. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, V.52, p.1423–1433, 2002.

HOSHIZAKI, S. Allozyme Polymorphism and Geographic Variation in the Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). **Biochemical Genetics**, V.35, n.11/12, p.383-393, 1997.

HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, V.125, p.1294-1295, 1957.

INÍGUEZ, A.M.; REINHARD, K.J.; ARAÏJO, A.; FERREIRA, L.F.; VICENTE, A.C.P. *Enterobius vermicularis*: Ancient DNA from North and South American Human Coprolites. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, V.98, p.67-69, 2003.

JEFFREY, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, V.314, p.67-73, 1985.

KAYSER, M.; BRAUER, S.; SCHÄDLICH, H.; PRINZ, M.; BATZER, M.A.; ZIMMERMAN, P.A.; B. A. BOATIN, B.A.; STONEKING, M. Populations of African, European, and Hispanic ancestry Y chromosome STR haplotypes and the genetic structure of U.S. **Genome Research**. V.13, p.624-634, 2003.

KOZIELL, I.; SWINGLAN, I.R. Collateral biodiversity benefits associated with 'free-market' approaches to sustainable land use and forestry activities. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, V.360, p.1807–1816, 2002.

KUDRYAVTSEV, A.M. Intravarietal heterogeneity of durum wheat is an important component of the species biodiversity. **Genetika**, V.42, n.10, p.1437–1440, 2006.

LÉVÊQUE, C. **A biodiversidade**. Bauru, Editora da Universidade do Sagrado Coração, 1999, 245p.

LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, V.54 p.595-609, 1966.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, M.T.G. Polimorfismo isozimático e potencial de utilização das isozimas como marcadores genéticos em aceroleira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, V.37, n.2, p.151-158, 2002.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America**, V.45, p.753-763, 1959.

MESSEGUER, J. Gene flow assessment in transgenic plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, V.73, p.201–212, 2003.

MAGIAFOGLOU, A.; HOFFMANN, A. Thermal

adaptation in *Drosophila serrata* under conditions linked to its southern border: unexpected patterns from laboratory selection suggest limited evolutionary potential. **Journal of Genetics**, V.82, n.3, p.179-189, 2003.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, V.24, n.1, p.105-111, 2001.

MOREIRA, H.W. Hemoglobinopatias no Brasil: um tema inesgotável. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, V.22, n.1, p.03-04, 2000.

MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, V.14, n.10, p.389-394, 1999.

NAGARAJA, J.; RANGANATH, N.; RANGANATH, H.A. Molecular phylogeny of the nasuta subgroup of *Drosophila* based on 12S rRNA, 16S rRNA and COI mitochondrial genes, RAPD and ISSR polymorphisms. **Genes Genet. Systematic.**, V.79, p.293-299, 2004.

O'BRIEN, S.J.; CEVARIO, S.J.; MARTENSON, J.S.; THOMPSON, M.A.; NASH, W.G.; CHANG, E.; GRAVES, J.A.M.; SPENCER, J.A.; CHO, K.W.; TSUJIMOTO, H.; LYONS, L.A. Comparative gene mapping in the domestic cat (*Felis catus*). **Journal of Heredity**, V. 88, p. 408-414, 1997.

OLIVER, S. G. From DNA sequence to biological function. **Nature**, V.379, p.597-600, 1996.

OLIVEIRA-COLLET, S.A.; ZEQUIM-MAIA, S.H.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Mutações e Recombinações Genéticas geram uvas coloridas: marcadores isoenzimáticos e RAPD em uvas finas de mesa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.35, p.28-35, 2005.

PEREIRA, L.V. **Seqüenciaram o Genoma Humano... E agora?.** São Paulo: Moderna, 2001, 111p.

PROCUNIER, W.S.; SMITH, J.J. Localization of ribosomal DNA in *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) by *in situ* hybridization. **Insect Molecular**

Biology, V.2, p.163-174, 1993.

RANZ, J.M.; SEGARRA, C.; RUIZ, A. Chromosomal homology and molecular organization of Muller's elements D and E in the *Drosophila repleta* species group. **Genetics**, V.145, p.281-295, 1997.

REIS, A.; SUASSUNA, N.D.; ALFENAS, A.C.; MIZUBUTI, E.S.G. Monitoramento da população de *Phytophthora infestans* na Região da Zona da Mata de Minas Gerais de 1998 a 2000. **Fitopatologia Brasileira**, V.27, p.614-620, 2002.

RESENDE, M.; LANI, J.L.; REZENDE, S.B. Pedossistemas da Mata Atlântica: considerações pertinentes sobre a sustentabilidade. **Revista Árvore**, V.26, n.3, p.261-269, 2002.

RIDLEY, M. **Evolução.** Tradução de Henrique Ferreira, Luciane Passaglia e Rivo Fisher. Porto Alegre: ARTMED, 3 ed., 2006, 752p. Original inglês.

RIEGER, T. T. ; LANGGUTH, A. ; WEIMER, T. A. . Allozymic characterization and evolutionary relationships in the Brazilian Akodon cursor species group (Rodentia-Cricetidae). **Biochemical Genetics**, V.33, n. 9/10, p.283-295, 1995.

RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; RAMPIM, L.; CARVALHO, V.P.; RUAS, E.A.; SERA, T. Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. **Genetics and Molecular Biology**, V.26, n.3, p.319-327, 2003.

RUIZ, A.; RANZ, J.M.; CÁCERES, M.; SEGARRA, C.; NAVARRO, A.; BARBADILLA, A. Chromosomal evolution and comparative gene mapping in the *Drosophila repleta* species group. **Brazilian Journal of Genetics**, V.20, p.553-565, 1997.

SALZANO, F. M.; BLACK, F. L.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SANTOS, S. E. B.; WEIMER, T. A.; MESTRINER, M. A.; PANDEY, J. P.; HUTZ, M. H.; RIEGER, T. T. Genetic variation within a linguistic group: Apalai-Wayana and other Carib Tribes. **American Journal of Physical Anthropology**, V.75, p.347-356, 1988.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, V.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- SANTANDREU, A.; PERAZZOLI, A. G.; DUBBELING, M. Biodiversidade, pobreza e agricultura urbana na América Latina. **Revista Agricultura Urbana**, n.6, p.1-7, 2002.
- SANTOS, G.P.C.; DOMINGOS, M.T.; WITTIG, E.O.; RIEDI, C. A.; ROSÁRIO, N.A. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. **Journal Pediatrics**, V.81, n.3, p.240-244, 2005.
- SANTOS, J. F.; RIEGER, T. T.; CAMPOS, S. R. S. L. C.; NASCIMENTO, A. C. C.; FÉLIX, P. T.; SILVA, S. V. O. E.; FREITAS, F. M. R. Colonization of Northeast Region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruitculture. **Drosophila Information Service**, V.86, p.92-95, 2003.
- SCHMIDT, I.B.; SAMPAIO, A. B.; BORGHETTI, F. Efeitos da época de queima sobre a reprodução sexuada e estrutura populacional de *Heteropterys pteropetala* (Adr. Juss.), Malpighiaceae, em áreas de Cerrado *sensu stricto* submetidas a queimas biennais. **Acta Botanica Brasilica**, V.19, n.4, p.927-934, 2005.
- SCHULER, G.D.; BOGUSKI, M.S.; STEWART, E.A.; STEIN, L.D.; GYAPAY, G.; RICE, K.; WHITE, R.E.; et al. A gene map of the human genome. **Science**, V.274, p.540-546, 1996.
- SCOTET, V.; BRAEKELEER, M.; ROUSSEY, M.; RAULT, G.; PARENT, P.; DAGORNE, M.; et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France: assessment of 10 years experience and impact on prenatal diagnosis. **Lancet**, V.356, p.789-94, 2000.
- SEGARRA, C.; LOZOVSKAYA, E.R.; RIBÓ, G.; AGUADÉ, M.; HARTL, D.L. P₁ clones from *Drosophila melanogaster* as markers to study the chromosomal evolution of Muller's A element in two species of the *obscura* group of *Drosophila*. **Chromosoma**, V.104, p.129-136, 1995.
- SKUCE, R.A.; MCCORRY, T.P.; MCCARROLL, J.F.; RORING, S.M.M.; SCOTT, A.N.; BRITTAIN, D.; HUGHES, S.L.; HEWINSON, R.G.; NEILL, S.D. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. **Microbiology**, V.148, p.519-528, 2002.
- SPICER, G.S.; BELL, C.D. Molecular phylogeny of the *Drosophila virilis* species group (Diptera: Drosophilidae) inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA genes. **Annals of the Entomological Society of America**, V.95, n.2, p.156-161, 2002.
- TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, V.29, p.51-655, 2004.
- THEOLOGIS, A.; ECKER, J.R.; PALM, C.J.; FEDERSPIEL, N.A.; KAUL, S.; WHITE, O.; ALONSO, J.; ALTAFI, H.; ARAUJO, R.; BOWMAN, C.L.; SHELISE, Y.; et al. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, V.408, p.796 - 815, 2000.
- VIANNA, J. A.; BONDE, R. K.; CABALLERO, S.; GIRALDO, J. P.; LIMA, R. P.; LARK, A. M.; MARMONTEL, M.; MORALESVELA, B.; SOUZA, M. J.; PARR, L.; RODRÍGUEZ-LOPEZ, M. A.; MIGNUCCIGIANNONI, A. A.; POWELL, J. & SANTOS, F. R. Phylogeography, phylogeny and hybridization in trichechid sirenians: implications on manatee conservation. **Molecular Ecology**, V. 15 n. 2: 433-447, 2006.
- VOSBERG, H.P. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. **Human Genetics**, V.83, p.1-15, 1989.
- WAGNER, G.P.; AMEMIYA, C.; RUDDLE, F. *Hox* cluster duplications and the opportunity for evolutionary novelties. **Proceedings of the National Academy**

Science of the United States of America, V.100, n.25, p.14603–14606, 2003.

WATSON, J.D.; CRICK, F.C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acids. **Nature**, V.171, p.737–738, 1953.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, V.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers re useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, V.18, p.6531-6535, 1990.

XU, M; LI, X.; KORBAN, S.S. AFLP-Based Detection of DNA Methylation. **Plant Molecular Biology Reporter**, V.18, p.361–368, 2000.

ZABEAU, M. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting**. European Patent Application N° 0534858 A1. 1993.

ZIMBACK, L.; BARBOSA, W.; MORI, E.S.; VEIGA, R.F.A. Caracterização e identificação das cultivares de pessegueiro tropical e douradão através de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.352-354, 2003.

ZUCOLOTO, R.B.; VILLELA, P.M.S.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman* spp and *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**, V.29, n.1, p.75-78, 2006.