

Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação

Catarina da Fonseca Lira Medeiros^{*1,2}, Monica Aires Cardoso¹,
Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira²

*Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brasil¹*

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil²

catilira@bioqmed.ufrj.br*

Recebido em 20 de outubro de 2006

Resumo

Os níveis de variabilidade genética populacionais podem ser determinados por marcadores moleculares, como RAPD e AFLP usados em estudos de fingerprinting, ou microssatélites, que são bastante utilizados em estudos de estrutura genética populacional, respondendo a questões ecológicas essenciais para a adoção de medidas conservacionistas. Atualmente são conhecidos microssatélites de regiões codificantes do genoma (SSR-EST), que têm como vantagem a transferabilidade entre espécies próximas em contraste aos microssatélites de regiões anônimas. Esta revisão visa divulgar esta nova modalidade de microssatélites, os SSR-ESTs, que estão sendo cada vez mais utilizados como ferramenta molecular eficiente para estudos populacionais com enfoque em conservação.

Palavras-chaves: SSR, marcadores moleculares, genética de populações

Use of microsatellite markers in conservation biology studies

Abstract

The levels of genetic population variability can be determined by molecular markers, as RAPD and AFLP in fingerprinting studies, or microsatellites, that are used in studies of population genetic structure, answering ecological questions that are essential for the adoption of conservation measures. Nowadays coding region microsatellites were discovered (SSR-EST), and they have the advantage of transferability between related species in contrast to the microsatellites of anonymous regions. This review aims the spreading of this new modality of microsatellites, SSR-ESTs, which are being more and more used as an efficient molecular tool for population studies with approach on conservation.

Key-words: SSR, molecular markers, population genetics

Introdução aos microssatélites

Dentre os diferentes níveis hierárquicos de biodiversidade, uma importância especial tem sido dada à

diversidade genética, que é a base desta hierarquia. Ela geralmente é observada ao nível de espécie, dentro de uma mesma população ou entre diferentes populações. A diversidade genética tem papel

importante na conservação de espécies ameaçadas e na manutenção de suas populações ao longo do tempo, pois espécies com baixa variação genética têm geralmente uma redução na habilidade de sobreviver a mudanças ambientais durante o seu processo evolutivo (Frankham, 1995)

As populações naturais possuem em geral altos níveis de variabilidade genética intrapopulacional, que é introduzida continuamente por mutação, migração ou fluxo gênico (Morand *et al.*, 2002), com exceção das espécies que têm reprodução preferencial por endogamia, o que contribui bastante para a diminuição da variabilidade genética em suas populações. Vários estudos já comprovaram que o fluxo gênico em florestas tropicais pode alcançar longas distâncias, sendo importante na manutenção da variabilidade genética (White *et al.*, 2002; Chase *et al.*, 1996), que é fundamental para a manutenção e sobrevivência da espécie e de suas populações, às ameaças causadas principalmente pelo homem (Heuertz *et al.*, 2001).

Tradicionalmente, a diversidade dentro de uma espécie era medida apenas pelas diferenças morfológicas, mas atualmente os métodos de detecção, baseados em dados moleculares, vêm sendo utilizados e considerados como vantajosos sobre os métodos antigos devido ao maior número de caracteres estudados (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Karp *et al.*, 1996).

Uma das técnicas mais importantes desenvolvida para estudos de marcadores moleculares é o PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação de Polimerase em Cadeia) que consiste numa reação em cadeia por ação da enzima DNA polimerase que copia fragmentos de DNA, desde que exposta a uma fita de DNA-molde, desoxirribonucleotídeos e oligonucleotídeos usados como iniciadores pela enzima polimerásica. O PCR foi inventado em 1983 por Kary Mullis, com base no seu conhecimento sobre seqüenciamento e oligonucleotídeos e, em 1987, junto com o matemático Fred Faloona foi possível provar que o PCR era verossímil e bastante eficiente, marcando o início da era genômica (Mullis & Faloona, 1987).

Dentre os seis principais marcadores moleculares, três não se utilizam do PCR – isoenzimas, RFLP

(Restricted Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição) e minissatélites – e por isso possuem limitações quanto ao número de indivíduos analisados por estudo, principalmente por causa da grande quantidade de material genético necessário e do excessivo trabalho laboratorial com resultados demorados e custosos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Por outro lado, os outros três são baseados em PCR – RAPD (Random Amplified DNA – DNA Amplificado ao Acaso), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo por Tamanho de Fragmento Amplificado) e microssatélites – e permitem a obtenção do resultado mais rapidamente, além de possibilitar estudos populacionais com grande número de indivíduos e também outros tipos de estudo como de genética humana, forenses, de biologia evolutiva e de biologia do desenvolvimento, devido à sensibilidade, velocidade e versatilidade do PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998; White *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1990).

Marcadores dominantes como RAPD e AFLP são usados para fazer análises de *fingerprinting* em diferentes organismos, inclusive plantas como *Eucalyptus* (Kirst *et al.*, 2005), *Caesalpinia echinata* (Cardoso *et al.*, 1998; Cardoso *et al.*, 2005), *Euterpe edulis* (Cardoso *et al.*, 2000), *Veronica alpina* (Albach *et al.*, 2006), *Viola sp.* (Eckstein *et al.*, 2006), *Cedrus atlantica* (Renau-Morata *et al.*, 2005), *Croton alabamensis* (Van EE *et al.*, 2006), com o objetivo de avaliar a variação genética e a estruturação populacional. Estas ferramentas são bastante eficientes em estudos com espécies selvagens, pois não necessitam de conhecimento prévio de seqüência de DNA e permitem a análise de uma grande quantidade de indivíduos. Além disso, são técnicas com baixos custos de desenvolvimento e operacional e que necessitam de pouca quantidade de DNA. Porém, uma desvantagem dessas técnicas é de não possuírem definição suficiente para estudos de parentesco ou mapeamento genético, por não possibilitarem a visualização dos alelos por locus, ou seja, a determinação de heterozigotos e homozigotos.

Os microssatélites ou SSR (Simple Sequence

Repeats – Repetições Simples de Sequência) são repetições em tandem de 1 a 6 nucleotídeos, encontrados em todos os procariotos e eucariotos estudados até o momento (Zane *et al.*, 2002). Os microssatélites foram encontrados no genoma de eucariotos no final da década de 80 (Tautz, 1989) e logo os pesquisadores perceberam os altos níveis de polimorfismo deste marcador, comprovando que se tratava de uma nova ferramenta molecular bastante eficiente, com pelo menos o dobro de informação obtida duas vezes mais rapidamente do que outros marcadores (Weber, 1990).

Um dos trabalhos mais significativos da época, provou a hipervariabilidade destes marcadores em *Drosophila melanogaster* e em baleias e a sua hereditariedade no homem (Tautz, 1989). Já na década de 90, trabalhos encontraram estes marcadores moleculares no genoma de plantas ocorrendo com frequência similar à encontrada no genoma de vertebrados (Akkaya *et al.*, 1992). Atualmente, sabemos que existem microssatélites tanto no genoma nuclear das plantas (Condit & Hubbell, 1991; Wang *et al.*, 1994) como no genoma de cloroplastos (Powell *et al.*, 1995).

A taxa de mutação do genoma de cloroplasto é baixa, o que era uma barreira para sua utilização em estudos populacionais até serem descobertos microssatélites de repetições mononucleotídicas ao longo deste genoma (Provan *et al.*, 2001). Acredita-se que os marcadores microssatélites de cloroplasto sejam uma ótima ferramenta em estudos de fluxo gênico e padrões de cruzamento (Provan *et al.*, 2001; Provan, 2000; Vendramin *et al.*, 2000). Além de estudos de avaliação da estrutura genética de populações vegetais e modo de herança do cloroplasto (Weising & Gardner, 1999) em gimnospermas *Picea abies* K (Vendramin *et al.*, 2000), *Abies sp* (Clark *et al.*, 2000; Vendramin *et al.*, 1999) e em angiospermas *Silene paradoxa* L (Mengoni *et al.*, 2001), *Fraxinus sp* (Morand-Prieur *et al.*, 2002) e *Caesalpinia echinata* (Lira *et al.*, 2003).

Os marcadores microssatélites tornaram-se extremamente difundidos na biologia, apesar do alto custo de desenvolvimento, sendo atualmente utilizados em

um grande número de estudos para investigar a estrutura genética de populações, respondendo a perguntas específicas nas áreas da biologia evolutiva e da biologia da conservação (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Isto se dá devido a três características presentes nos microssatélites: (1) a neutralidade, pois representam o genoma inteiro; (2) a abundância com ampla distribuição pelo genoma; e (3) o alto polimorfismo encontrado mesmo em populações que passaram por eventos como gargalos ou em populações que possuem baixo polimorfismo detectado por outros marcadores (Maudet *et al.*, 2002).

Microssatélites são marcadores codominantes, ou seja, podem ser observados ambos os alelos presentes no mesmo *locus*, possibilitando a sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos através da detecção da estrutura genética de populações isoladas e fragmentadas, possibilitando análises do sistema reprodutivo de plantas e animais e suas conseqüências como porcentagem de heterozigosidade nas populações (Morand *et al.*, 2002; Collevatti *et al.*, 2001; Heuertz *et al.*, 2001; White *et al.*, 1999). Através dos oligonucleotídeos complementares às seqüências flanqueadoras das repetições dos microssatélites, são obtidos produtos de tamanhos variados correspondendo às expansões e/ou contrações da região repetitiva (Provan *et al.*, 2001).

A maior limitação ao uso de marcadores microssatélites é o grande trabalho necessário para o desenvolvimento e isolamento dos *loci* que contêm estes marcadores (Zane *et al.*, 2002), principalmente para plantas, cujo número de repetições de dinucleotídeos é 10 vezes menor do que nos primatas. Para contornar esta situação foram desenvolvidos diferentes métodos de enriquecimento de bibliotecas genômicas (White & Powell, 1997; Edwards *et al.*, 1996; Ostrander *et al.*, 1992). Zane *et al.* (2002) indicam diferentes tipos de isolamento de microssatélites, porém todos são bastante custosos, o que gera um empecilho para se trabalhar com estes marcadores moleculares. Após seu isolamento, faz-se necessário tornar os iniciadores desenvolvidos para a amplificação via PCR dos *loci* microssatélites funcionais através da otimização das condições ideais do próprio PCR. Este segundo passo pode tornar-se tão problemático quanto o primeiro

Tabela 1. Ferramentas para busca de microssatélites em bancos de dados de ESTs. Adaptado de Varshney *et al.* (2005).

Table 1. Tools for microsatellite research in EST's databases. Adapted from Varshney *et al.* (2005).

| Programa | Ref. |
|--|---|
| MicroSATellite (MISA) | http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/ ; Thiel <i>et al.</i> (2003) |
| SSRFinder | Gao <i>et al.</i> (2003) |
| BuildSSR | Rungis <i>et al.</i> (2004) |
| SSR Identification Tool (SSRIT) | Kantety <i>et al.</i> (2002) |
| Tandem Repeat Finder (TRF) | Benson (1999) |
| Tandem Repeat Occurrence Locator (TROLL) | Castelo <i>et al.</i> (2002) |
| CUGIssr | http://www.genome.clemson.edu/projects/ssr/ |
| Sputnik | http://abajian.net/sputnik/index.html |
| Modified Sputnik | Morgante <i>et al.</i> (2002) |
| Modified Sputnik II | http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/LaRota/ |
| SSRSEARCH | ftp://ftp.gramene.org/pub/gramene/software/scripts/ssr.pl |

passo de isolamento, em termos de dinheiro e tempo gasto (Squirrell *et al.*, 2003).

Com o estabelecimento de bancos de dados de seqüências expressas do genoma (EST – Expressed Sequence Tags – Partes de Seqüências Expressas), uma nova modalidade de microssatélites foi descoberta, os microssatélites gênicos ou EST-SSR. O desenvolvimento destes marcadores é relativamente fácil e tem baixo custo porque são utilizadas seqüências disponibilizadas na internet e programas de computador distribuídos gratuitamente para isolar o microssatélite gênico e desenhar os oligonucleotídeos iniciadores do PCR (Varshney *et al.*, 2005). As principais vantagens desta técnica segundo Woodhead *et al.* (2005) são: 1) regiões codificantes possuem menor taxa de mutação o que diminuiria a ocorrência de alelos nulos e ainda permitiria uma maior transferabilidade destes marcadores entre espécies; 2) o baixo nível de mutação resultaria também em menor homoplasia; 3) alguns trabalhos com espécies cultivadas obtiveram fragmentos mais limpos com bandas melhor definidas do que aquelas obtidas com os microssatélites genômicos.

Microssatélites em regiões não-codificantes e codificantes

O método tradicional para o desenvolvimento de marcadores microssatélites envolve a criação de

bibliotecas genômicas de inserto pequeno, a posterior hibridização com oligonucleotídeos repetidos em tandem e o seqüenciamento de clones candidatos, tornando assim o processo lento, trabalhoso e caro (Thiel *et al.*, 2003).

EST (Expressed Sequence Tags – Partes de Seqüências Expressas) são porções seqüenciadas de cDNA (DNA complementar), que são cópias do mRNA (RNA mensageiro). Por isso, eles representam parte da porção transcrita do genoma em certas condições e são bastante conservados entre espécies próximas (Poncet *et al.*, 2006). O aumento no número de banco de dados de ESTs disponíveis permitiu a busca de microssatélites derivados de ESTs (SSR-EST), diminuindo assim o tempo e dinheiro necessários para o seu isolamento (Thiel *et al.*, 2003).

O Instituto TIGR (The Institute for Genomic Research – www.tigr.org) possui um banco de dados de ESTs com 232 espécies de plantas, dentre elas estão 10 coníferas, 150 dicotiledôneas e 41 monocotiledôneas. A grande maioria destas espécies é de importância econômica, e por isso é difícil encontrar seqüências de espécies selvagens que não são cultivadas ou não têm interesse econômico cujo estudo visa apenas a sua conservação.

Para a identificação dos microssatélites derivados de ESTs, alguns programas foram criados na linguagem Pearl como o MISA (MicroSATellite) que é um

Tabela 2. Resumo de algumas questões ecológicas que podem ser respondidas com marcadores genéticos neutros, separados por tipo de dados necessário. Adaptado de Selkoe & Toonen (2006).
Table 2. Summary of some ecological questions that can be answered with neutral genetic markers, separated for the type of data necessary. Adapted from Selkoe & Toonen (2006).

Necessita de dados de frequência alélica multi-locus*

- De qual população estes indivíduos se originaram?
- Quantas populações existem?

Necessita de dados de microssatélites ou alto polimorfismo de sequência**

- Esta população se expandiu ou se contraiu nos últimos anos?
- As populações são diferentes em tamanho no passado e no presente?

Necessita de identificação genotípica multi-locus***

- Qual a relação genética entre os indivíduos?
- Quais indivíduos migraram?
- Quais indivíduos são clones?

Pode ser feito com diferentes marcadores moleculares**

- Qual a distância de dispersão média dos descendentes (ou gametas)?
 - Quais são as relações fonte-sumidoro entre as populações?
 - Como condições do meio-ambiente causam impacto na estrutura populacional e migração?
 - Qual a dinâmica de extinção e recolonização da metapopulação?
 - A estrutura populacional ou sua conectividade mudou nos últimos anos?
-

*Estas análises podem necessitar de >10 microssatélites – o número está inversamente correlacionado com o grau de diferenciação genética entre as populações. Espécies com baixa taxa de migração e/ou populações pequenas necessitam de menos *loci*.

**Usando >1 *locus* diminuirá substancialmente erro amostral interlocus.

***Geralmente necessita de microssatélites, mas também é possível com AFLP e RAPD

módulo de busca com várias características úteis para o controle de qualidade das seqüências de ESTs e para o desenvolvimento de iniciadores que amplificarão os *loci* contendo microssatélites (Varshney *et al.*, 2005). Na Tabela 1 estão algumas destas ferramentas de busca.

A avaliação de germoplasmas usando microssatélites derivados de ESTs pode aumentar o poder dos marcadores moleculares permitindo examinar a diversidade funcional em plantas fenotipicamente bem caracterizadas, pois expansões e contrações das repetições destes SSR-ESTs de genes de função conhecida podem ser relacionadas com variação fenotípica ou, melhor ainda, com função biológica (Eujayl *et al.*, 2002).

Com relação às plantas, os microssatélites isolados a partir de seqüências ESTs estão sendo bastante utilizados em espécies cultivadas como trigo, cevada,

café, laranja, amêndoa e girassol (Gao *et al.*, 2004; Thiel *et al.*, 2003; Poncet *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2006; Pashley *et al.*, 2006).

Uma das grandes vantagens destes marcadores provenientes de regiões expressas do genoma é a transferabilidade entre espécies relacionadas em contraste aos microssatélites de regiões anônimas, refletindo a natureza conservadora das regiões codificantes quando comparada às regiões não-codificantes (Varshney *et al.*, 2005b). A posição dos microssatélites gênicos com relação à região codificante resulta em diferentes níveis de polimorfismo, onde as regiões 3'UTR (Untranslated Regions – Regiões Não-Traduzidas) são mais polimórficas no nível de cultivares, as regiões 5'UTR são mais polimórficas entre cultivares e espécies, e a seqüência codificante do gene é mais polimórfica entre espécies e gêneros (Varshney *et al.*, 2005).

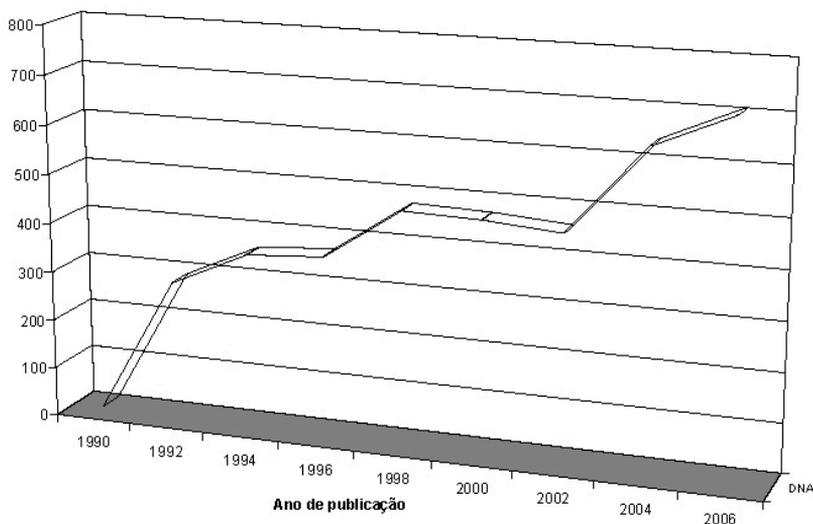


Figura 1. Número de artigos referente à pesquisa realizada pela ferramenta Web of Science do site ISI Web of Knowledge [v3.0] (<http://isiknowledge.com>) utilizando como palavras-chaves conservação (conservation) e DNA.

Figure 1: The number of articles resulting from the research made by the tool search Web of Science of the site ISI Web of Knowledge [v3.0] (<http://isiknowledge.com>) using the keywords conservation and DNA.

Aplicações dos microssatélites para conservação

Segundo Liu & Cordes (2004), os marcadores moleculares AFLP e microssatélites estão ainda em fase exponencial de crescimento com relação ao número de trabalhos publicados utilizando estas ferramentas e por isso eles parecem ser os principais atores na revolução genômica.

Devido à alta variabilidade dos microssatélites e à possibilidade de se obter marcadores mendelianos multi-alélicos, eles são especialmente úteis para inferir eventos demográficos recentes, inclusive detecção de impactos induzidos pelas comunidades humanas nas populações (Pearse & Crandall, 2004). Os microssatélites emergiram como uma das opções mais populares para estudos genéticos com questões ecológicas, em parte porque eles possuem potencial para determinar estimativas de migração, têm poder para distinguir relativamente altas taxas de migração para panmixia, e podem estimar a relação de parentesco entre os indivíduos (Selkoe & Toonen, 2006).

Os principais marcadores moleculares citados na introdução, que são considerados marcadores neutros, podem ser utilizados em diferentes tipos de

estudos ecológicos com o objetivo de responder a perguntas importantes sobre a biologia da espécie e suas populações. Na Tabela 2, temos algumas destas questões ecológicas e o tipo de dados moleculares que são necessários para respondê-las.

Dentre as principais aplicações dos microssatélites estão mapeamento genético, identificação individual por DNA e estudos de parentesco, filogenia, genética de populações e genética da conservação, epidemiologia e patologia molecular, mapeamento de QTLs (Quantitative Trait Loci – Loci de Traços Quantitativos), e seleção assistida por marcador (Chistiakov *et al.*, 2006).

Os microssatélites vêm sendo muito utilizados para responder várias perguntas relacionadas à genética de populações, como análises de fluxo gênico, paternidade e estruturação populacional, que resultam em dados sobre a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações naturais, que são essenciais para a adoção de medidas de conservação tanto *ex situ* quanto *in situ* (Oliveira *et al.*, 2006).

A obtenção de dados sobre a variabilidade genética permite um melhor entendimento de processos

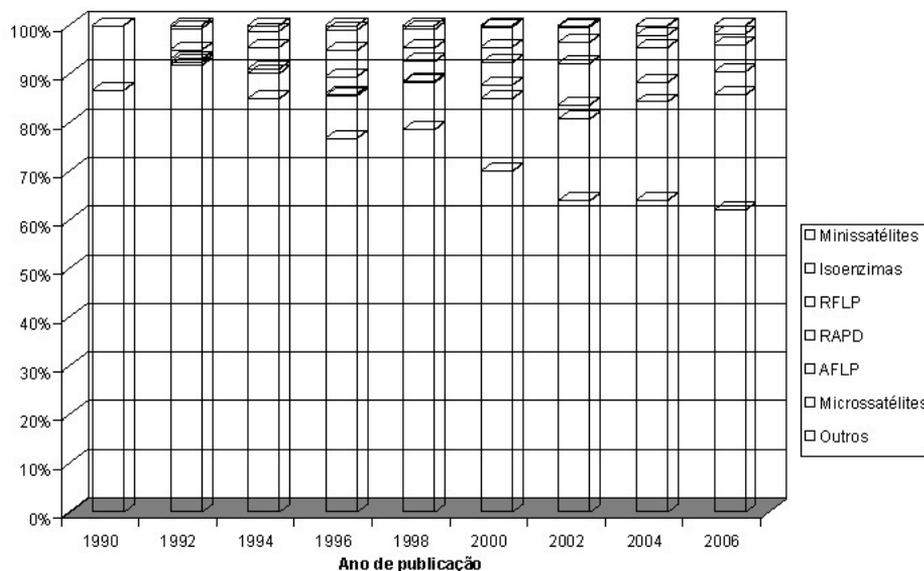


Figura 2. Número de artigos referente à pesquisa realizada pela ferramenta Web of Science do site ISI Web of Knowledge [v3.0] (<http://isiknowledge.com>) utilizando como palavras-chaves DNA, microsatélites (microsatellite), AFLP, RAPD, RFLP, isoenzimas (isozyme), minissatélites (minisatellite), juntamente com a palavra conservação (conservation).

Figure 2. The number of articles resulting from the research made by the tool search Web of Science of the site ISI Web of Knowledge [v3.0] (<http://isiknowledge.com>) using the keywords DNA, microsatellite, AFLP, RAPD, RFLP, isozyme, minisatellite, all with the word conservation.

populacionais como dispersão e migração, história demográfica de populações como gargalos e efeito fundador, detecção de híbridos entre espécies, fluxo gênico e deriva gênica, filogeografia, ecologia de paisagem como distribuição, movimentos e dispersão dos animais, e ecotoxicologia (deYoung & Honeycutt, 2005).

Publicações atuais sobre conservação

O número de publicações utilizando ferramentas moleculares em estudos de conservação é cada vez maior, de apenas 13 artigos em 1990 aumentou para 710 artigos em 2006. Na figura 1, o gráfico com a evolução do número de artigos publicados bianualmente nos últimos 16 anos mostra três saltos significativos quanto ao número de publicações utilizando o DNA como ferramenta: de 1990 para 1992, com a diferença de 276 artigos; de 1996 para 1998, com diferença de 106 artigos; e de 2002 para 2004, com diferença de

178 artigos. Uma possível explicação para este rápido incremento na quantidade de artigos publicados por ano, é a implementação e o desenvolvimento de novas técnicas que, além de aumentarem a eficiência dos procedimentos, tornaram-se capazes de reduzir seus custos.

De todas estas publicações com DNA, as mais significativas com relação à conservação utilizam microsatélites como ferramenta. E os três principais marcadores moleculares baseados em PCR, RAPD, AFLP e os próprios microsatélites, são os mais representativos, enquanto que os outros marcadores, RFLP, isoenzimas e minissatélites, têm menor difusão para este tipo de estudo.

A Figura 2 mostra a tendência de uma expansão na utilização dos marcadores microsatélites em estudos de conservação, seguidos de forma menos expressiva pelos marcadores AFLP e RAPD. Além disso, pode ser ainda observado o uso cada vez menor dos marcadores RFLP, isoenzimas e minissatélites, devido às

suas duas maiores desvantagens: grande quantidade de material necessário e trabalho laboratorial intenso e custoso.

Conclusão

Os microssatélites são ferramentas bastante robustas e importantes para estudos genéticos de diversidade visando a conservação das espécies (Selkoe & Toonen, 2006). Um dos limitantes de uso desta ferramenta é justamente o isolamento dos marcadores microssatélites a partir de DNA genômico em bibliotecas enriquecidas com repetições de di ou trinucleotídeos (Squirrel *et al.*, 2003).

Com o surgimento de bancos de dados de ESTs, que são seqüências codificantes do genoma, e com o constante aumento no número de espécies estudadas e seqüências depositadas, foi possível obter microssatélites presentes nestas regiões do genoma através de uma busca relativamente simples dentro dos bancos de dados. Muitos programas já foram desenvolvidos com o objetivo de facilitar o isolamento destes marcadores (Varshney *et al.*, 2005).

Atualmente a maioria das publicações utilizando-se desta ferramenta visa o mapeamento genético e o estudo da diversidade funcional de espécies cultivadas ou com importância econômica, sendo os microssatélites de regiões anônimas os mais importantes em estudos de *fingerprinting* e identificação parietal (Varshney *et al.*, 2005). No entanto, os SSR-ESTs representam uma ferramenta adicional para geneticistas populacionais de plantas ou ecologistas moleculares, pois trabalhos examinando a sua transferibilidade entre espécies e os resultados com populações naturais indicam que estes marcadores são muito mais estáveis e fáceis de amplificar do que os microssatélites de regiões anônimas do genoma (Woodhead *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2006).

Um limitante dos microssatélites gênicos seria justamente a possível seleção que este marcador sofreria, mas Woodhead *et al.* (2005) perceberam que a diferenciação genética não estava sendo afetada pela seleção, pois os valores de F_{st} – definido por Pearse & Crandall (2004) como o parâmetro padrão usado

para descrever o nível de diferenciação entre subpopulações – baseados em SSR-EST, SSR genômico e AFLP foram parecidos. Aparentemente, portanto, os microssatélites derivados de ESTs parecem ser geralmente neutros podendo ser usados em estudos de efeito demográfico sobre o nível de variação genética, muito comuns em estudos de conservação de espécies (Ellis *et al.*, 2006).

Bibliografia

ALBACH DC, SCHÖNSWETTER, P.; TRIBSCH, A. Comparative phylogeography of the *Veronica alpina* complex in Europe and North America. **Molecular Ecology**, V.15, n.11, p.3269-3286, 2006.

AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in Soybean. **Genetics**, V.132, n.4, p.1131-1139, 1992.

BALLOUX, F. ; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, V.11, n.2, p.155-165, 2002.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, V.27, n.2, p.573-580, 1999 **apud** VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, V.23, n.1, p.48-55, 2005.

CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; DE OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, V.7, n.5, p.601-608, 1998.

CARDOSO, S.R.S.; ELOY, N.B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C.G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**,

V.9, n.11, p.1753-1760, 2000.

CARDOSO, S.R.S.; PROVAN, J.; LIRA, C.F.; PEREIRA, L.O.R.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. **Biodiversity and Conservation**, V.14, n.5, p.1047-1057, 2005.

CASTELO, A.T. ; MARTINS, W. ; GAO, G.R. TROLL – Tandem Repeat Occurrence Locator. **Bioinformatics**, V.18, n.4, p.634-636, 2002 **apud** VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, V.23, n.1, p.48-55, 2005.

CHASE, M.R.; MOLLER, C.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Distant gene flow in tropical trees. **Nature**, V.383, n.6599, p.398-399, 1996.

CHEN, C.; ZHOU, P.; CHOI, Y.A.; HUANG, S.; GMITTER, F.G. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, V.112, n.7, p.1248-1257, 2006.

CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, V.255, n.1-4, p.1-29, 2006.

CLARK, C.M.; WENTWORTH, T.R.; O'MALLEY, D.M. Genetic discontinuity revealed by chloroplast microsatellites in eastern north american *Abies* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, V.87, n.6, p.774-782, 2000.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, V.86, n.1, p.60-67, 2001.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA

sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, V.34, n.1, p.66-71, 1991.

DEYOUNG, R.W.; HONEYCUTT, R.L. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. **Journal of Wildlife Management**, V.69, n.4, p.1362-1384, 2005.

ECKSTEIN, R.L.; O'NEILL, R.A.; DANIHELKA, J.; OTTE, A.; KÖHLER, W. Genetic structure among and within peripheral and central populations of three endangered floodplain violets. **Molecular Ecology**, V.15, n.9, p.2367-2379, 2006.

EDWARDS, K.J.; BARKER, J.H.A.; DALY, A.; JONES, C.; KARP, A. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. **Biotechniques**, V.20, n.5, p.758-760, 1996.

ELLIS, J.R.; PASHLEY, C.H.; BURKE, J.M.; MCCAULEY, D.E. High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener. **Molecular Ecology**, V.15, n.9, p.2345-2355, 2006.

EUIJAYL, I.; SORRELLS, M.E.; BAUM, M.; WOLTERS, P.; POWELL, W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. **Theoretical and Applied Genetics** V.104, n.2-3, p.399-407, 2002.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

GAO, L.; TANG, J.; LI, H.; JIA, J. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. **Molecular Breeding**, V.12, n.3, p.245-261, 2003 **apud** VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, V.23, n.1, p.48-55,

2005.

GAO, L.F.; JING, R.L.; HUO, N.X.; LI, Y.; LI, X.P.; ZHOU, R.H.; CHANG, X.P.; TANG, J.F.; MA, Z.Y.; JIA, J.Z. One hundred and one new microsatellite loci derived from ESTs (EST-SSRs) in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, V.108, n.7, p.1392-1400, 2004.

HEUERTZ, M.; HAUSMAN, J.F.; TSVETKOV, I.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; VEKEMANS, X. Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). **Molecular Ecology**, V.10, n.7, p.1615-1623, 2001.

KANTETY, R.V.; LA ROTA, M.; MATTHEWS, D.E.; SORRELLS, M.E. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant Molecular Biology**, V.48, n.5-6, p.501-510, 2002 **apud** VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, V.23, n.1, p.48-55, 2005.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, V.78, n.2, p.143-149, 1996.

KIRST, M.; CORDEIRO, C.M.; REZENDE, G.D.S.P.; GRATTAPAGLIA, D. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Journal of Heredity**, V.96, n.2, p.161-166, 2005.

LIRA, C.F.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; PROVAN, J. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellite. **Molecular Ecology**, V.12, n.12, p.3219-3225, 2003.

LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics.

Aquaculture, V.238, n.1-4, p.1-37, 2004.

MAUDET, C.; MILLER, C.; BASSANO, B.; BREITENMOSER-WÜRSTEN, C.; GAUTHIER, D.; OBEXER-RUFF, G.; MICHALLET, J.; TABERLET, P.; LUIKART, G. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex (ibex)*]. **Molecular Ecology**, V.11, n.3, p.421-436, 2002.

MENGONI, A.; BARABESI, C.; GONNELLI, C.; GALARDI, F.; GABBRIELLI, R.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, V.10, n.8, p.1909-1916, 2001.

MORAND, M.E.; BRACHET, S.; ROSSIGNOL, P.; DUFOUR, J.; FRASCARIA-LACOSTE, N. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. **Molecular Ecology**, V.11, n.3, p.377-385, 2002.

MORAND-PRIEUR, M.E.; VEDEL, F.; RAQUIN, C.; BRACHET, S.; SIHACHAKR, D.; FRASCARIA-LACOSTE, N. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. **Molecular Ecology**, V.11, n.3, p.613-617, 2002.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially present with non-repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, V.30, p.194-200, 2002 **apud** VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, V.23, n.1, p.48-55, 2005.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, V.155, Part F, p.335-350, 1987.

- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, V.29, n.2, p.294-307, 2006.
- OSTRANDER, E.A.; JONG, P.M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomics DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, V.89, n.8, p.3419-3423, 1992.
- PASHLEY, C.H.; ELLIS, J.R.; MCCAULEY, D.E.; BURKE, J.M. EST databases as a source for molecular markers: Lessons from *Helianthus*. **Journal of Heredity**, V.97, n.4, p.381-388, 2006.
- PEARSE, D.E.; CRANDALL, K.A. Beyond Fst: Analysis of population genetic data for conservation. **Conservation Genetics**, V.5, n.5, p.585-602, 2004.
- PONCET, V.; RONDEAU, M.; TRANCHANT, C.; CAYREL, A.; HAMON, S.; DE KOCHKO, A.; HAMON, P. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. **Molecular Genetics and Genomics**, V.276, n.5, p.436-449, 2006.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; MCNICOL, J.W.; MACHRA, Y.; DOYLE, J.J.; TINGEY, S.V.; RAFALSKI, J.A. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. **Current Biology**, V.5, n.9, p.1023-1029, 1995.
- PROVAN, J. Novel chloroplast microsatellites reveal cytoplasmic variation in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Ecology**, V.9, n.12, p.2183-2185, 2000.
- PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P.M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, V.16, n.3, p.142-147, 2001.
- RENAU-MORATA, B.; NEBAUER, S.G.; SALES, E.; ALLAINGUILLAUME, J.; CALIGARI, P.; SEGURA, J. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphism DNA. **American Journal of Botany**, V.92, n.5, p.875-884, 2005.
- RUNGIS, D.; BÉRUBÉ, Y.; ZHANG, J.; RALPH, S.; RITLAND, C.E.; ELLIS, B.E.; DOUGLAS, C.; BOHLMANN, J.; RITLAND, K. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. **Theoretical and Applied Genetics**, V.109, n.6, p.1283-1294, 2004.
- VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, V.23, n.1, p.48-55, 2005.
- SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, V.9, n.5, p.615-629, 2006.
- SHEMSKE, D.W.; HUSBAND, B.C.; RUCKELSHAUS, M.H.; GOODWILLIE, C.; PARKER, I.M.; BISHOP, J.G. EVALUATING APPROACHES TO THE CONSERVATION OF RARE AND ENDANGERED PLANTS. **ECOLOGY**, V.75, n.3, p.584-606, 1994.
- SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P.M.; WOODHEAD, M.; RUSSELL, J.; LOWE, A.J.; GIBBY, M.; POWELL, W. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology**, V.12, n.6, p.1339-1348, 2003.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, V.17, n.16, p.6463-6471, 1989.
- THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.).

Theoretical and Applied Genetics, V.106, n.3, p.411-422, 2003.

Van EE, B.W.; JELINSKI, N.; BERRY, P.E.; HIPPI, A.L. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. **Molecular Ecology**, V.15, n.9, p.2735-2751, 2006.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, V.23, n.1, p.48-55, 2005.

VARSHNEY, R.K.; SIGMUND, R.; BORNER, A.; KORZUN, V.; STEIN, N.; SORRELLS, M.E.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science*, V.168, n.1, p.195-202, 2005b.

VENDRAMIN, G.G. ; DEGEN, B. ; PETIT, R.J. ; ANZIDEI, M. ; MADAGHIELE, A. ; ZIEGENHAGEN, B. High level of variation at *Abies alba* chloroplast microsatellite loci in Europe. **Molecular Ecology**, V.8, n.7, p.1117-1126, 1999.

VENDRAMIN, G.G.; ANZIDEI, M.; MADAGHIELE, A.; SPERISEN, C.; BUCCI, G. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). **Genome**, V.43, n.1, p.68-78, 2000.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, V.88, n.1, p.1-6, 1994.

WEBER, J.L. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, V.1, n.2, p.166-171, 1990.

WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, V.42, n.1,

p.9-19, 1999.

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, V.6, n.9, p.851-860, 1997.

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, V.5, n.6, p.185-189, 1989.

WHITE, G.M.; BOSCHER, D.H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, V.8, n.11, p.1899-1909, 1999.

WHITE, G.M.; BOSCHER, D.H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: An example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, V.99, n.4, p.2038-2042, 2002.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, V.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WOODHEAD, M.; RUSSELL, J.; SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P.M.; MACKENZIE, K.; GIBBY, M.; POWELL, W. Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. **Molecular Ecology**, V.14, n.6, p.1681-1695, 2005.

XIE, H. ; SUI, Y. ; CHANG, F.Q. ; XU, Y. ; MA, R.C. SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.). **Theoretical and Applied Genetics**, V.112, n.2, p.366-372, 2006.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, V.11, n.1, p.1-16, 2002.