



ARTIGO

## Estimativa da taxa de mutação de 15 locos autossômicos de microssatélites na população de Goiânia, GO

Fabiely da Silva Rodrigues<sup>1</sup>, Daniela de Melo e Silva<sup>1,2,3,4\*</sup>, Caroline Oliveira Araújo Melo<sup>2,3</sup>, Myrzzia Beatriz Silva<sup>2,3</sup>, Ricardo Goulart Rodovalho<sup>3</sup>, Emília Oliveira Alves Costa<sup>2,3</sup>, Tháís Cidália Vieira<sup>1,2,4</sup> e Aparecido Divino da Cruz<sup>1,2,3,4</sup>

Recebido: 17 de setembro de 2009

Recebido após revisão: 01 de fevereiro de 2010

Aceito: 11 de março de 2010

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1383>

**RESUMO:** (Estimativa da taxa de mutação de 15 locos autossômicos de microssatélites na população de Goiânia, GO). O presente estudo teve por objetivo estimar a taxa de mutação de 15 locos autossômicos STR na população de Goiânia, Goiás, com a finalidade de criar um banco de dados de interesse para cálculos estatísticos, tanto em testes de vínculo genético quanto em estudos sobre mutações induzidas. Mutações da linhagem germinativa de 15 locos de STR foram estudadas por análises de 6.450 transferências alélicas genitor-criança, a partir de 215 casos de testes de paternidade, todos realizados em Goiânia, no período de janeiro a dezembro de 2008. As amostras foram coletadas por punção venosa, o DNA foi extraído e amplificado por PCR e submetido à análise no seqüenciador automático MEGABACE 500, para a obtenção dos perfis alélicos de cada marcador. Foram identificadas 11 mutações em 5 locos. Os resultados mostraram taxas de mutação variando entre  $2 a 9 \times 10^{-3}$  mutações/loco/região, com o total de  $2 \times 10^{-3}$ . Foi encontrada uma maior taxa de mutações de origem materna, o que difere de outros estudos semelhantes, provavelmente devido ao pequeno número de meioses analisadas, quando comparado com resultados de outros estudos. A comparação direta dos perfis genéticos individuais quanto às taxas de mutação, para cada loco, apresentou mais ganho de unidades de repetição (54,5%) do que perdas (45,4%). Todos os ganhos envolveram apenas uma unidade de repetição, seguindo o modelo de mutação passo a passo. Apesar do pequeno tamanho amostral analisado, os cálculos das taxas de mutação nos 15 locos autossômicos estudados, mostraram-se importantes para a incorporação desses valores em futuras análises de vínculo genético, a serem efetuadas na população de Goiânia e entorno, na tentativa de minimizar erros em testes de paternidade.

**Palavras-chave:** frequência mutacional, microssatélite, teste de vínculo genético.

**ABSTRACT:** (Estimating mutation rates in 15 microsatellite autosomal loci in Goiania population, GO). The present study had the aim to estimate the mutation rate at 15 STR autosomal loci in Goiania population, GO state, attempting to generate a genetic database of interested for statistical calculations, such as in paternity tests or in studies about induced mutations. Germline mutation of 15 STR loci was studied for 6,450 parent-child transfers from 215 paternity testing cases, all of them carried out in Goiania, from January to December of 2008. We collected blood samples, DNA was extracted and amplified by PCR and the analysis was carried out in the automatic sequencer MEGABACE 500, to obtain the allelic peaks for each genetic marker. We identified 11 mutations in 5 loci. The results indicated that mutation rates varied from 2 to  $9 \times 10^{-3}$  mutations/loci/marker and the total mutation rate was  $5 \times 10^{-3}$ . It was found a higher mutation rate of maternal origin, differing of similar studies, probably due to the small number of meiosis analyzed, when compared to the results of another studies. When we analyzed the individual genetic profiles and compared by direct analysis, related to the mutation rates, for each locus, this study presented more gain of repetitive units (54.5%) than losses (45.4%). All the gains involved only one repetitive unit, following the stepwise mutation model. Despite the small sample size, the mutation rates of the 15 autosomal loci showed the importance to incorporate such values in future analysis of paternity tests carried out in Goiania population and nearby attempting to decrease mistakes in paternity tests.

**Key words:** mutation frequency, microsatellite, paternity tests.

### INTRODUÇÃO

Microssatélites ou seqüências repetidas *em tandem* (STR) constituem aproximadamente 10% do genoma humano e podem ser utilizadas como marcadores moleculares na genotipagem do DNA, visando detectar a variabilidade genética intra ou inter populacional. Tais marcadores possuem de 2 a 6 pares de base e aparecem preferencialmente dispersos no genoma. Também são conhecidos como SSR (Repetições de Sequências Simples), sendo polimórficos, hipervariáveis e codominantes, revelando variações de comprimento entre os alelos

(Oliveira *et al.* 2006). Estes marcadores podem estar presentes tanto em regiões codificadoras, quanto em não codificadoras, estando associados à regulação da expressão gênica e outras funções celulares (Zane *et al.* 2002).

Os microssatélites podem ser classificados de acordo com o tipo do cerne de repetição como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos. A hipervariabilidade dos microssatélites é mantida principalmente pelo pareamento errôneo dos filamentos polinucleotídicos, durante a replicação do DNA, com o deslize da enzima DNA polimerase (Ferreira e Grattapaglia 1998, Weber e Wong 1993). O número de repetições pode aumentar

1. Programa de Pós-Graduação *Latu Sensu*, Especialização em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

2. Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Rua 235, n.º40, CEP 74.605-010, Goiânia, GO, Brasil.

3. Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

4. Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular, Superintendência Leide das Neves Ferreira, Secretaria de Estado da Saúde de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: [danielamelo@pucgoias.edu.br](mailto:danielamelo@pucgoias.edu.br)

ou diminuir, caso ocorra à adição ou perda de uma ou mais unidades de repetição pela DNA polimerase e se houver falha na atividade exonucleásica dessa enzima. Em células pré-germinativas, as alterações podem ser transmitidas aos descendentes (Ellegren 2004).

A metodologia de genotipagem com STR baseia-se na amplificação por PCR das sequências simples repetidas, utilizando um par de *primers* de sequências complementares àquelas que as flanqueiam. É uma técnica eficaz para analisar amostras com pouca quantidade de DNA ou com DNA degradado (Kashyap *et al.* 2004). Desta forma, os marcadores microssatélites podem gerar grandes quantidades de informações genéticas que são disponibilizadas em bancos de dados (Gill *et al.* 2006, Wheeler *et al.* 2002). Esses bancos de dados gerados constituem fontes de pesquisas em diversas áreas, como em estudos populacionais, análises forenses, identificação de vínculo genético, identificação de restos de pessoas desaparecidas e bases de frequências alélicas para aplicação estatística (Butler 2006, Rodrigues *et al.* 2007).

Devido ao elevado grau de polimorfismo, resultante de suas altas taxas mutacionais, os locos STR são amplamente utilizados como marcadores em testes de paternidade. Pela estimativa destas taxas é possível identificar o perfil genético correto dos indivíduos e determinar o número de mutações que podem ser consideradas como casos de exclusão da paternidade (Kayser & Sajantila 2001).

Em decorrência da miscigenação da população brasileira, vários estudos têm demonstrado a variabilidade genética dos marcadores STR em populações localizadas em distintas áreas geográficas do nosso país (Gois 2006, Grattapaglia *et al.* 2005, Deka *et al.* 1995). Visto que ainda não há estudo semelhante na cidade de Goiânia, GO, os dados utilizados para os cálculos estatísticos em estudos de vínculo genético são de outras populações. Dessa forma, este estudo se faz importante para minimizar erros estatísticos decorrentes de sub-estruturação populacional.

O objetivo deste estudo foi estimar a taxa de mutação de 15 locos autossômicos STR, recomendados pela Sociedade Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG),

na população de Goiânia, GO, para criar um banco de dados de interesse para cálculos estatísticos, tanto em testes de vínculo genéticos, quanto em estudos sobre mutações induzidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Mutações da linhagem germinativa de 15 locos de STRs foram estudadas por análises de 6450 transferências alélicas genitor-criança, a partir de 215 casos de testes de paternidade, todos realizados em Goiânia, estado de GO, no período de janeiro a dezembro de 2008. Todos os testes apresentaram índices de paternidade oscilando em torno de 99,999%. As amostras dos 645 indivíduos foram obtidas por punção venosa de sangue periférico, o DNA foi extraído utilizando o kit GFX (GE Healthcare, EUA), seguindo as instruções do fabricante e quantificado em espectrofotômetro (Genequant-GE Healthcare, EUA).

O DNA foi amplificado por PCR mutiplex (PowerPlex 16, Promega Corporation, EUA) utilizando o protocolo de 12,5 µL de solução contendo 100 ng de DNA, tampão 10× da enzima, cloreto de magnésio a 50 mM, 10 ng de solução contendo 15 oligonucleotídeos fluorescentes marcados com os fluoróforos FAN, HEX e NED e 0,5 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen, EUA). O termociclador DNA IQ 5 (Biorad, EUA) foi utilizado nas reações de amplificação do sistema multiplex PowerPlex 16 (Promega Corporation, EUA), de acordo com orientações do fabricante.

Para a leitura dos produtos de PCR, foi utilizado o sequenciador automático de DNA MEGABACE 500 (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). A análise dos produtos de PCR para obtenção dos perfis alélicos foi feita com o auxílio do programa *Fragment Profiler v.12* (GE Healthcare), sendo os resultados confirmados em cada eletroferograma. Os fragmentos em pares de bases foram convertidos para seus respectivos alelos para posterior análise estatística. Os 15 STR utilizados nesse estudo estão listados na Tabela 1.

As mutações foram consideradas e contadas nos testes nos quais ocorreram simples discrepâncias entre um dos pais e a criança, em um determinado loco, quando os demais locos STR foram consistentes com paternidade

**Tabela 1.** Características dos 15 marcadores STR utilizados nas análises de vínculo genético.

Locus STR	Localização cromossômica	Sequência repetitiva 5' → 3'
Penta E	15q	AAAGA
D18S51	18q21.3	AGAA (21)
D21S11	21q11.21q21	TCTA Complexo (21)
TH01	11p15.5	AATG (21)
D3S1358	3p	TCTA Complexo
FGA	4q28	TTTC Complexo (21)
TPOX	2p23.2pter	AATG
D8S1179	8q	TCTA Complexo (21)
vWA	12p12.pter	TCTA Complexo (21)
Penta D	21q	AAAGA
CSF1PO	5q33.3.34	AGAT
D16S539	16q24.qter	GATA
D7S820	7q11.21.22	GATA
D13S317	13q22.q31	TATC
D5S818	5q23.3.32	AGAT

**Tabela 2.** Mutações observadas nos 15 locos autossômicos STRs analisados na população de Goiânia, GO, Brasil.

Locus	Origem Paterna			Origem Materna			Total		
	Meioses	NM	TM	Meioses	NM	TM	Meiose	NM	TM
D16S539	215	0	0	215	1	0,5%	430	1	0,2%
D3S1358	215	0	0	215	1	0,5%	430	1	0,2%
FGA	215	3	1,4%	215	0	0	430	3	0,7%
PENTA E	215	0	0	215	2	0,9%	430	2	0,5%
D21S11	215	2	0,9%	215	2	0,9%	430	4	0,9%
D18S51	215	0	0	215	0	0	430	0	0
TH01	215	0	0	215	0	0	430	0	0
TPOX	215	0	0	215	0	0	430	0	0
D8S1179	215	0	0	215	0	0	430	0	0
vWA	215	0	0	215	0	0	430	0	0
PENTA D	215	0	0	215	0	0	430	0	0
CSF1PO	215	0	0	215	0	0	430	0	0
D7S820	215	0	0	215	0	0	430	0	0
D13S317	215	0	0	215	0	0	430	0	0
D5S818	215	0	0	215	0	0	430	0	0
<b>Total</b>	<b>3225</b>	<b>5</b>	<b>0,16%</b>	<b>3225</b>	<b>6</b>	<b>0,2%</b>	<b>6450</b>	<b>11</b>	<b>0,2%</b>

NM, número de mutações; TM, taxa de mutação.

e/ou maternidade. Todas as mutações foram confirmadas por duas corridas eletroforéticas distintas.

## RESULTADOS

A taxa mutacional total para os 15 marcadores analisados foi de  $2 \times 10^{-3}$  (Tab. 2) Foram também analisados, de acordo com a sequência de repetição, o número de mutações e as taxas de mutação por loco (Tab. 2). A comparação dos perfis genéticos individuais para as mutações mostrou mais ganho de unidades de repetição (54,5%) do que perdas (45,4%). Todos os ganhos envolveram apenas uma unidade de repetição, estando de acordo com o modelo mutacional passo a passo. Finalmente, foram detectadas no total 11 mutações, sendo seis de origem materna e cinco de origem paterna.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A maior incidência de mutações de origem materna encontradas neste estudo difere de outros estudos, provavelmente devido ao pequeno número de casos aqui analisados. No estudo de Andrade (2009), na população do estado de Pernambuco, foram analisados 2575 casos de paternidade em 14 locos STR, totalizando 54.105 transferências alélicas genitor-criança. Foram detectadas 43 mutações germinativas, principalmente de origem paterna. Geralmente, as taxas de mutação são cerca de cinco vezes maiores em células de linhagem paterna, devido à rapidez das divisões celulares que ocorrem nas células precursoras dos gametas masculinos, durante a espermatogênese (Yan *et al.* 2006, Kayser & Sajantila 2001). Segundo Ellegren (2004), quanto maior o número de divisões que ocorrem em uma célula, maior será a frequência de mutações.

De acordo com Xu *et al.* (2000), o comprimento do cerne de repetição parece ser um fator responsável pelas altas taxas mutacionais nos locos STR. Como foi observado nesse trabalho, o marcador D21S11, que é um tetranucleotídeo e possui elevado número de alelos,

apresentou 36% do total de mutações, com uma taxa mutacional total de  $9 \times 10^{-3}$ .

Diversos valores referentes a taxas de mutação em locos STR têm sido descritos. No estudo de Whittle *et al.* (2004), foram analisados 13 mil indivíduos da população brasileira, provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Brasília), com 19 marcadores autossômicos STR e taxas mutacionais variando de 0 a  $3,2 \times 10^{-3}$ . O marcador com maior número de alelos foi o FGA e a taxa mutacional variou de 1,2 a  $2,9 \times 10^{-3}$ . Os índices obtidos neste trabalho indicam que marcadores STR apresentam elevadas e variáveis taxas de mutação, como discutido por diversos autores (Tab. 3), e estão de acordo com os valores obtidos em outros estudos, apesar do tamanho amostral reduzido.

Altas taxas de mutação ao longo de gerações podem ocasionar divergências intra-populacionais, com diferenças inter-individuais (Dek *et al.* 1995, Cavalli-Sforza *et al.* 1994). Segundo Rosenberg *et al.* (2002), as diferenças dentro das populações contribuem de 93 a 95% para a variação genética, enquanto diferenças entre grupos determinam de 3 a 5% da variação genética total.

As taxas de mutação dos microssatélites, além de variar entre diferentes populações, como indicadas na tabela 3, também podem ser influenciadas por fatores externos, como as radiações ionizantes. No estudo de da Cruz *et al.* (2008), com 12 marcadores STR em 10 famílias de Goiânia, GO, nas quais pelo menos um dos progenitores foi exposto acidentalmente ao Césio-137, foi verificada uma taxa mutacional de  $11 \times 10^{-3}$ . Com a determinação da taxa de mutação basal para essa população, é possível agora calcular o real aumento da taxa de mutações determinado pelo efeito da radiação nessa população. A probabilidade de detecção de mutações nos locos STR é elevada, em torno de 1,2% a 4,85%, em casos de parentesco verdadeiro (Brenner 2004). Assim, as variações dos índices das taxas mutacionais observados nos locos STR demonstram a importância das análises estatísticas, do uso de bancos de dados da população analisada, assim como das estimativas das taxas de mutação para estudos

**Tabela 3.** Taxas de mutação de diversos marcadores STR em populações do Brasil e do mundo.

Loco	Populações								
	Goiânia	Alemanha	PE	Brasil	RS	USA	Argentina	China	Inglaterra
D16S539	0,2%	-	0,06%	0,007%	0,3%	0,1%	-	0,06%	1,30%
D3S1358	0,2%	0	-	0,1%	0	0,1%	-	-	-
FGA	0,7%	0,6%	-	0,06%	0,7%	0,3%	-	0,7%	-
PENTA E	0,9%	-	-	0,2%	-	0,2%	-	-	-
D21S11	0,9%	0,9%	0,2%	0,2%	0,5%	0,2%	0,4%	0,2%	0%
D8S1179	0%	0%	0,07%	0,095%	0,38%	0,14%	0,18%	0,1%	0%
D7S820	0%	0,46%	0,1%	0,013%	0,09%	0,1%	0,18%	0,08%	0%
CSF1PO	0%	0%	0,12%	0%	0,56%	0,16%	0,18%	0,06%	0%
TH01	0%	-	0,02%	0%	0%	-	-	-	-
D13S317	0%	0%	0,02%	0,09%	0,03%	0,14%	0,18%	0,06%	0%
vWA	0%	-	0,1%	0,09%	0,2%	-	-	-	-
D18S51	0%	0,41%	0,2%	0,2%	0,4%	0,22%	-	0,26%	0,62%

PE, Pernambuco; RS, Rio Grande do Sul.

de identificação humana.

Para garantir uma determinação precisa do vínculo genético pesquisado deve-se incluir na avaliação estatística dos testes de paternidade a taxa de mutação específica para a população em questão. Apesar do pequeno tamanho amostral analisado, o cálculo das taxas de mutação nos 15 locos autossomos estudados mostrou-se importante para análises de vínculo genético a serem efetuadas na população de Goiânia e entorno, na tentativa de minimizar erros em testes de paternidade.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e à CAPES (Edital Pró-Equipamentos 02/2007) pelos apoios financeiro e logístico no desenvolvimento desse estudo. A co-autora E.A.O.C agradece à Comissão Nacional de Energia Nuclear pela concessão da bolsa de estudos, nível mestrado acadêmico.

### REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. S., GOMES, A. V., RAPOSO, G., DA SILVA, L. M. & DOS SANTOS-SILVA, R. 2009. Mutation rates at 14 STR loci in the population from Pernambuco, Northeast Brazil. *Forensics Science International*, 3(4): 141-143.
- CRUZ, C. D. & SILVA, L. D. C. E. 2006. Análise de Marcadores Moleculares. In: ALUIZIO BORÉM; EVELINE TEIXEIRA CAIXETA. (Org.). *Marcadores Moleculares*. 1. ed. Viçosa: Editora Jard. p. 307-374.
- BRENNER, C. H. 2004. Multiple mutations, covert mutations and false exclusions in paternity casework. *International Congress Series*, 1261: 112-114.
- BUTLER, J. M. 2006. Genetics and Genomics of core STR loci used in human identity testing. *Forensics Science International*, 51(2): 253-265.
- CAVALLI-SFORZA, L. L., MENOZZI, P. & PIAZZA, A. 1994. *History and geography of human genes*. Princeton University Press. 1118 p.
- da CRUZ, A.D., SILVA, D. M., da SILVA, C. C., NELSON, R. J., RIBEIRO, L. M., PEDROSA, E. R., JAIME, J. C. & CURADO, M. P. 2008. Microsatellite mutations in the offspring of irradiated parents nineteen years after the Cesium-137 accident. *Mutation Research*, 652: 175-179.
- DEKA, R., SHRIVER, M. D., YU, L. M., FERREL, R. E. & CHAKRABORTY, R. 1995. Intra and Inter population diversity at short tandem repeat loci in diverse populations of the world. *Electrophoresis*, 16: 1659-1664.
- ESTOUP, A., JARNE, P. & CORNUET, J. M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.
- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews – Genetics*, 5: 435-445.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 2. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen. 220 p.
- GILL, P., LYN, F., NIELS, M. & PETRE, M. S. 2006. The evolution of DNA databases- Recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International*, 156:242-244.
- GOÍ S. C. C. 2006. *Estudo de frequências alélicas de 12 microssatélites do cromossomo Y na população brasileira de Araraquara e da região da grande São Paulo* (Dissertação de Mestrado). São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2006.
- GRATTAPAGLIA, D., KALUPNIEK, S., GUIMARÃES, C. T., RIBEIRO, M. A., DIENER, P. S. & SOARES, C. N. 2005. Y-chromosome STR haplotype diversity in Brazilian populations. *Forensic Science International*, 149(1): 99-107.
- KAYSER, M. & SAJANTILA, A. 2001. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Science International*, 118: 116-121.
- KASHYAP, V. K., SITALAXIMI, T., CHATTOPADHYAY, P. & TRIVEDI, R. 2004. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. *International Journal of Human Genetics*, 4(1):11-30.
- OKAMOTO, O., YAMAMOTO, Y., INAGAKI, S., YOSHITOME, K., ISHIKAWA, T., IMABAYASHI, K., MIYASHI S., ISHIZU H. 2003. Analysis of short tandem repeat (STR) polymorphisms by the PowerPlex 16 System and capillary electrophoresis: application to forensic practice. *Acta Medica Okayama*, 57(2): 59-71.
- OLIVEIRA, E. J., PÁDUA, J. G., ZUCCHI, M. I., VENCOSKY, R. & VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.
- RODRIGUES, E. M. R., PALHA, T. J. & SANTOS, S. E. B. 2007. Allele frequencies data and statistic parameters for 13 STR loci in a population of the Brazilian Amazon Region. *Forensic Science International*, 168: 244-247.
- ROSENBERG, N. A., PRITCHARD, J. L., CANN, H. M., KIDD, K. K., ZHIVOTOVSKY, L. A. & FELDMAN, M. W. 2002. Genetic structure of human populations. *Science*, 298: 2381-2385.
- WEBER, J. L. & WONG, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human and Molecular Genetics*, 2: 1123-1128.
- WHEELER, D. L., CHURCH, D. M., LASH, A. E., LEIPE, D. D., MADDEN, T. L., PONTIUS, J. U., SCHULER, G. D., SCHRIML, L. M., TATUSOVA, T. A., WAGNER L. & RAPP, B. A. 2002. Database resources of the National center for Biotechnology Information: 2002 update. *Nucleic Acids Research*, 30(1): 13-6.

- WHITTLE, M. R., ROMANO, N. L. & NEGREIROS, V. A. C. 2004. Updated Brazilian genetic data, together with mutation rates, on 19 STR loci, including D10S1237. *Forensic Science International*, 139: 207-210.
- XU, X., PENG, M., FANG, Z., XU, X. 2000. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics*, 24: 396-399.
- YAN, J., LIU, Y., TANG, H., ZHANG, Q., HU, Z. & YU, J. 2006. Mutations at 17 STR loci in Chinese population. *Forensic Science International*, 162: 53-54.
- ZANE, L., BARGELLONI, L. & PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.