

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**APLICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES (STR) DE BOVINOS EM
ANIMAIS DE RAÇAS ZEBUÍNAS**

Autora: Márcia Cristina Andrezza

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima

PORTO ALEGRE

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**APLICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES (STR) DE BOVINOS EM
ANIMAIS DE RAÇAS ZEBUÍNAS**

Autora: Márcia Cristina Andrezza

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Biologia Celular Molecular

Orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima

Co-orientadora: Maria Luiza Saraiva
Pereira

PORTO ALEGRE

2006

A557a Andreazza, Márcia Cristina

Aplicação de microssatélites (STR) de bovinos em animais de raças zebuínas./ Márcia Cristina Andreazza. – Porto Alegre: UFRGS, 2006.

51 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2006. Elizabeth Obino Cirne-Lima, Orient.

1. Bos indicus 2. Bos taurus 3. Identificação Genética
4. Microssatélite 5. Genética : biologia molecular I. Cirne-Lima,
Elizabeth Obino, Orient. II. Pereira, Maria Luiza Saraiva, Co-orient.
III. Título.

CDD 636.082

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Márcia Cristina Andreazza

**APLICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES (STR) DE BOVINOS EM ANIMAIS DE
RAÇAS ZEBUÍNAS**

Aprovada em 22 FEVEREIRO 2006

APROVADO POR:

Prof. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Termignoni
Membro da Comissão

Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Júnior
Membro da Comissão

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Membro da Comissão

Prof. Dr. Rui Fernando Félix Lopes
Membro da Comissão

*Aos meus pais Nestor José Andrezza e
Rosa Lia Brandalise Andrezza
Às minhas irmãs Estela Leticia e Roberta Simone
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial:

À minha orientadora durante o primeiro ano de mestrado, Prof^a Dra. Ana Paula Ravazzolo, pela oportunidade de ingressar neste programa de Pós-Graduação, pelos seus ensinamentos e amizade, agradeço profundamente.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima, pela acolhida no momento em que pensei em desistir do mestrado e pela sua dedicação, minha eterna gratidão.

À minha co-orientadora, Prof^a Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira, pela oportunidade de desenvolver este projeto, por seus ensinamentos e pela sua dedicação na conclusão deste trabalho, sou infinitamente grata.

Ao Serviço de Genética Médica do HCPA, na pessoa do Prof. Roberto Giugliani, aos integrantes do Laboratório de Genética Molecular e do Laboratório de Identificação Genética do HCPA, pelas gentilezas, companheirismo e ajuda quando necessária. À Ana Carolinaardini, André Zoratto Gastaldo e Rodrigo Rodenbusch, meu carinho e gratidão. Em especial ao Hugo Bock, pois sem sua ajuda, dedicação e carinho, este trabalho não seria tão bem realizado.

A todos do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Reprodução do HCPA. Principalmente à Ana Ayala, Ana Paz, Andréia Taffarel, Ludmila Miquelito e Paula Terraciano, meu carinho e gratidão.

Aos membros da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ) e aos proprietários dos animais incluídos na presente dissertação, que sempre estiveram disponíveis, nos acolheram de forma gentil e colaboraram de forma expressiva para a realização deste trabalho.

À Márcia Lima Peluffo e Jair Alves, pela compreensão de minhas ausências e pelo eterno incentivo, agradeço com carinho.

Aos meus pais, Nestor e Rosa, pelo amor e incentivo incondicionais, meu eterno agradecimento.

À minha irmã Roberta, pela eterna amizade, agradeço, com a certeza de que sem seu incentivo este projeto não se realizaria.

À minha irmã Estela, pela paciência, amizade, incentivo e felicidade contagiante, agradeço com carinho.

Ao meu ex-marido Leonardo Ortolan, pelo companheirismo, amizade e dedicação em todo tempo em que estivemos juntos, pelo eterno incentivo, meu profundo agradecimento.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, pela convivência que foi imprescindível em minha formação pessoal e profissional. À Anna Paula, Carla, Cíntia, Clarissa, Cristiana, Edna, Fabrício, Laura, Marina, Marisa, Simone e Ubirajara, agradeço com muita saudade.

Aos amigos do HCPA, pela sincera amizade e convívio adorável. À Thaís Santa Rita, Tamara Vaccaro, Fernanda Godinho, Anamaria Zaccolo e Marina Siebert, agradeço com carinho.

Ao grande amigo Vanderlei Biolchi, pela amizade e apoio na fase inicial do mestrado.

Aos funcionários da secretaria deste programa de Pós-Graduação, Maria, Vera e Jociane.

RESUMO

O gado zebu (*Bos indicus*) é predominante em todo o mundo. Atualmente, no Brasil, o rebanho de bovinos e zebuínos é composto por aproximadamente 170 milhões de indivíduos, no qual, 80% são zebuínos ou animais de raças cruzadas com zebu. O principal objetivo deste estudo foi determinar a possibilidade da utilização de marcadores moleculares de bovinos na identificação genética de zebuínos. A confirmação desta possibilidade seria de extrema valia, já que a quantidade de informações sobre o genoma zebuíno é limitada e metodologias específicas de identificação de marcadores genéticos para raças zebuínas são raras. Assim, o DNA de 65 zebus, de 4 raças diferentes (Gir, Tabapuã, Nelore e Brahman), foi extraído a partir de sangue aplicado em papel filtro, utilizando o “kit” *DNA IQ™ SYSTEM* (Promega®). Após a extração de DNA, foi feito um PCR Multiplex utilizando o “kit” *StockMarks®* (Applied Biosystems®), o qual amplifica um total de 11 *loci* (BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227 e TGLA53). Os fragmentos gerados pela PCR foram analisados por eletroforese capilar utilizando o analisador genético *ABI Prism 3100* (Applied Biosystems®) e o programa *GeneScan®* v.3.7 (Applied Biosystems®). A frequência dos marcadores e os índices de variabilidade genética foram calculados utilizando o programa *Microsatellite Toolkit* v.3.1 e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi determinado através do programa *GENEPOP* v.3.4. Através destas técnicas foi possível demonstrar que os marcadores moleculares utilizados para identificação genética de bovinos podem também ser utilizados para a realização da técnica de identificação genética de zebuínos. Além disso, foi possível demonstrar a frequência alélica na população de zebuínos analisada como um todo, assim como foi determinada a frequência alélica para os diferentes marcadores moleculares dentro das 4 raças estudadas. Considerando o total de 100 diferentes alelos identificados entre os 11 STR (*Short Tandem Repeats*) analisados, foi possível observar que a heterozigosidade esperada (H_e) foi relativamente alta na população analisada, assim como na análise por raça. Estes dados indicam alto grau de diversidade genética nas diferentes raças. Neste sentido, a raça Brahman apresentou a menor diversidade (0,60) e a raça Tabapuã, a maior (0,69). Contudo, estudos complementares são necessários, a fim de confirmar as frequências alélicas estabelecidas, uma vez que os resultados encontrados no presente trabalho referem-se a um número relativamente pequeno de zebuínos, quando comparados com o total de zebus encontrados no rebanho brasileiro.

ABSTRACT

*Zebu cattle (*Bos indicus*) are the widespread cattle of the world. At the moment, the beef and milk cattle in Brazil possess approximately 170 million individuals of which 80% are zebu or crossbred zebu animals. The main objective in the present study was to analyze the possibility to apply bovine molecular markers to zebuine genetic identification. The confirmation of this possibility would be extremely valuable, since the quantity of information concerning the zebuine genome is limited, and specific methodologies to identify genetic markers are rare. The DNA of 65 zebus, from 4 different breeds (Gir, Tabapuã, Nelore and Brahman) was extracted from bloodstain in paper using the DNA IQ™ SYSTEM kit (Promega®). After the DNA extraction, Multiplex PCR was performed with the StockMarks® kit (Applied Biosystems®), which amplifies 11 loci (BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA227 e TGLA53). The fragments generated from PCR were analyzed by capillary electrophoresis using the ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®) Genetic Analyzer and the GeneScan® v.3.7 (Applied Biosystems®) software. The markers frequency and the genetic variability indices were calculated using the Microsatellite Toolkit v.3.1 and the Hardy-Weinberg equilibrium was determined with GENEPOP v.3.4. Through these techniques it was possible to demonstrate that the molecular markers used for the bovine genetic identification could be also applied to the zebuine genetic identification. Besides, it was possible to demonstrate the allelic frequency for the different molecular markers in the four breeds studied. Considering a total of 100 different alleles identified in the 11 STR (Short Tandem Repeats) analyzed, it was possible to observe that the expected heterozygosity (H_e) was relatively high in the analyzed population and by breed. In this way, the Brahman breed presents the lower diversity (0.60) and the Tabapuã breed, the higher (0.69). Although, complementary studies are necessary, in order to confirm the established allelic frequency once the data presented in the current work refers to a relatively low number of zebuines, when compared with the total population of zebus in the Brazilian cattle.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Distribuição da localização das propriedades	27
Figura 2 - Representação da aplicação do sangue em papel filtro	28
Figura 3 - Representação da localização dos marcadores no genoma bovino.....	30
Figura 4 - Eletroferogramas dos onze <i>loci</i> utilizados neste estudo da amostra do animal controle	34
Figura 5 - Eletroferogramas dos onze <i>loci</i> utilizados neste estudo da amostra de um animal zebuíno da raça Gir	35

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Sistemas de grupos sanguíneos em bovinos e seus respectivos fatores sanguíneos	19
Tabela 2 - Distribuição por raça dos animais incluídos no estudo	27
Tabela 3 - Lista de cada <i>locus</i> testado com sua localização cromossômica e tamanho dos alelos em bovinos	30
Tabela 4 - Protocolo para preparo da mistura dos reagentes do PCR	31
Tabela 5 - Protocolo para preparo das amostras para eletroforese capilar	31
Tabela 6 - Parâmetros de realização da eletroforese capilar no Analisador Genético ABI <i>Prism</i> 3100.....	32
Tabela 7 - Distribuição e frequência alélica dos marcadores BM1824, BM2113, ETH10 e ETH225	37
Tabela 8 - Distribuição e frequência alélica dos marcadores ETH3, INRA023, SPS115 e TGLA122	38
Tabela 9 - Distribuição e frequência alélica dos marcadores TGLA126, TGLA227 e TGLA53	39
Tabela 10 - Representação dos índices de variabilidade genética, faixa de tamanho e número de alelos observados nos 11 STR analisados	41

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Filogenia e diversidade de bovinos e zebuínos	15
2.2 Melhoramento genético	17
2.3 Testes de verificação de parentesco	18
2.3.1 Tipagem sanguínea	18
2.3.2 Tipagem por DNA	20
2.4 Identificação dos genomas bovino e zebuino	24
2.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	25
2.6 Variabilidade genética	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Coleta das amostras	28
3.3 Extração de DNA das amostras	28
3.3.1 Protocolo adaptado	28
3.4 PCR Multiplex	29
3.5 Análise e identificação dos fragmentos de DNA por eletroforese capilar.....	31
3.6 Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Identificação dos STR em zebuínos	34
4.2 Frequências alélicas	35
4.3 Variabilidade genética	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos mais importantes centros de criação e seleção de raças zebuínas. Do total do rebanho brasileiro, 80% (aproximadamente 170 milhões de cabeças) apresenta uma composição genética de zebuínos, que se concentra nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Os estados da Bahia e Rio Grande do Sul também se destacam como grandes produtores. Portanto, há um grande contingente de gado zebuíno no Brasil e este contribui para a produção de carne e leite de forma cada vez mais expressiva (NOGUEIRA, 2004).

O impacto econômico positivo do material genético zebuíno para a pecuária brasileira é consideravelmente superior ao do material genético das raças européias. Este impacto econômico proporcionou a instalação de uma pecuária auto-sustentável no país, não dependente de fatores externos e nem de modificações constantes do meio-ambiente natural de que dispomos. Ou seja, o gado zebuíno possui uma adaptabilidade e rusticidade que lhe confere alta tolerância ao calor, assim como capacidade de se desenvolver sob condições de oferta nutricional reduzida como acontece nas regiões de clima semi-árido do Brasil Central (LÔBO, 1998; MUKESH *et al.*, 2004).

A grande variabilidade genética encontrada nas raças zebuínas se constitui em fator adicional para possíveis e grandes progressos zootécnicos, que têm sido verdadeiramente alcançados ao longo dos vários anos de seleção, através de programas de melhoramento animal, bem estruturados e condizentes com um mercado cada vez mais exigente e globalizado.

A seleção de diferentes raças, em bovinos de corte, por exemplo, é feita com base na seleção de indivíduos que possuam um valor genético superior para características como crescimento, precocidade, rusticidade, entre outros. Esses animais são usados como reprodutores na geração seguinte, alterando-se a constituição genética do rebanho, obtendo-se assim um incremento na produtividade.

Outra maneira de promover o melhoramento genético é por meio de sistemas de cruzamentos que visam à exploração da heterose (cruzamento de indivíduos não

relacionados geneticamente). Mas, nesse sistema, existe grande dificuldade para a manutenção dos benefícios ao longo das gerações, ou seja, a probabilidade de recuperação do melhor genótipo diminui ao longo do tempo.

O correto parentesco entre reprodutores é de grande importância para um eficiente programa de melhoramento genético animal. Muitas dessas questões de parentesco podem ser resolvidas pelos testes convencionais, como grupos sanguíneos e proteínas do soro. Entretanto, em alguns casos, esses polimorfismos não são suficientes para esclarecer a correta paternidade. Em função disso, foram desenvolvidos outros métodos para determinação da paternidade, como os marcadores genéticos que podem auxiliar os sistemas de cruzamento e, com isso, maximizar a probabilidade de recuperação dos genótipos de interesse na progênie.

Os testes de tipagem sanguínea tiveram um grande valor como exames que forneciam informações contidas nos *pedigrees*, com eficiência em 98% dos casos (OLIVEIRA & KUABARA, 2001). Mas, com o desenvolvimento da genética molecular iniciado na primeira metade do século XX com a identificação da molécula de DNA, muitos marcadores genéticos foram mapeados, tornando-se ferramentas importantes para o melhoramento genético e iniciando uma nova fase com a análise do DNA.

Os marcadores moleculares podem auxiliar no melhoramento animal, na seleção de reprodutores e em estratégias de acasalamento, com o objetivo de maximizar o ganho genético em curto prazo e preservar a diversidade genética da população por longos períodos.

Os STR (do inglês, *short tandem repeats*), pequenas seqüências de nucleotídeos repetidas no DNA, são atualmente os principais marcadores genéticos utilizados para análise de parentesco. O que diferencia os indivíduos é o número de vezes que estas seqüências se repetem. Eles vêm sendo aperfeiçoados nos últimos anos à medida que vão sendo estudados em diversas raças de bovinos.

A tipagem sanguínea em animais está sendo substituída gradativamente pelos testes de DNA (microsatélites), pois alguns casos de identificação individual ou de definição de parentesco não são resolvidos por tipagem sanguínea. Além disso, a

tipagem de DNA não necessita de grandes quantidades de material biológico, possui maior acurácia quando comparado aos testes de tipagem sanguínea e não faz restrição ao tipo de tecido a ser analisado, podendo ser usados, além de sangue, sêmen congelado e, em alguns casos, tecidos degradados, pêlos, ossos e dentes.

Desta forma, considerando o impacto das raças zebuínas no mercado nacional, o aumento de qualidade deste rebanho, o alto valor agregado dos animais, a utilização de biotécnicas da reprodução como práticas rotineiras no manejo dos animais, parece ser relevante a identificação genética desses animais, a fim de garantir a eficiência e qualidade da produção, já que, *pedigrees* confiáveis se traduzem em bons resultados e maior lucratividade.

No presente trabalho será testada a utilização de 11 STR de bovinos para identificação genética de zebuínos. Uma vez estabelecida essa metodologia, será determinada a frequência alélica em cada marcador e a variabilidade genética do conjunto de alelos encontrados nas amostras de animais das 4 raças zebuínas incluídas nesse estudo. Além disso, o equilíbrio de Hardy-Weinberg será aplicado para cada marcador molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filogenia e diversidade de bovinos e zebuínos

A biodiversidade animal é resultante de efeitos genéticos e ambientais levando a características morfológicas, fisiológicas e produtivas. As condições climáticas do local, a disponibilidade de alimento e a incidência de doenças afetam a adaptação animal ao meio ambiente. Além disso, a tendência genética, assim como a seleção natural ou artificial, contribui fortemente para a diferenciação de criações, populações e linhagens de animais (CERIOTTI *et al.*, 2003).

A relação filogenética entre animais de criação foi investigada através do nível protéico, por meios de marcadores bioquímicos e grupos sanguíneos (CAMINHAS *et al.*, 1992; CERIOTTI *et al.*, 2003) e melhor analisado pelo DNA através da análise de microssatélites (MACHUGH *et al.*, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2000; RITZ *et al.*, 2000; HANOTTE *et al.*, 2002) e por DNA mitocondrial (LOFTUS *et al.*, 1994; BRADLEY *et al.*, 1996).

A sistemática e a relação evolutiva dos bovinos são muito contraditórias e as pesquisas baseiam-se nas diferentes características morfológicas e genéticas observadas entre as duas principais espécies do gênero *Bos*, o zebu (*Bos indicus*) e o taurino (*Bos taurus*), sendo que uma das diferenças morfológicas entre eles é a presença de cupim nos zebuínos e a ausência dessa característica nos taurinos (LOFTUS *et al.*, 1994; MACHUGH *et al.*, 1997).

Embora esses dois animais mostrem uma variação fenotípica marcada e sejam reorganizados em espécies separadas (*Bos indicus* e *Bos taurus*), a composição das raças cruzadas é difícil de ser verificada, exceto se os registros detalhados de seus progenitores estejam disponíveis (MACHUGH *et al.*, 1997).

A análise da variação da seqüência da região controle do DNA mitocondrial, usando seqüências de *Bison sp* como grupo controle, sugere que as duas espécies divergiram a mais de 200.000 anos atrás (BRADLEY *et al.*, 1996). Essa divergência relativamente grande é interpretada como evidência para dois eventos independentes de

domesticação, indicando que sejam subespécies de auroques (*Bos primigenius*) de diferentes centros separados geograficamente, sendo que essas seqüências de DNA mitocondrial eram de origem européia e africana para os taurinos e indiana para os zebuínos (LOFTUS *et al.*, 1994).

A origem e a história da breve dispersão do pastoreio africano para o oeste e sul do continente ainda permanece desconhecida, assim como o padrão de introgressão de *Bos indicus*, o qual é conhecido por ter influência na maioria das populações da África (MACHUGH *et al.*, 1997).

As impressões digitais do DNA do pastoreio africano foram estudadas em 50 animais de criação pelo uso de 15 microssatélites, revelando que os gados bovino e zebuínos tiveram origens dentro do continente africano, mas identificou também influências genéticas Européias e do Oriente Próximo (HANOTTE *et al.*, 2002). Em outro estudo, 20 microssatélites foram analisados e revelaram uma grande divergência entre as espécies analisadas. Com base nestes resultados, os autores apresentam os tempos de divergência estimados para *Bos taurus* e *Bos indicus* em, aproximadamente, 0,31 a 0,82 milhões de anos e sugerem uma reorganização no gênero *Bos* (RITZ *et al.*, 2000).

Visando estimar a variabilidade de quatro microssatélites em um rebanho bovino híbrido (Nelore e Aberdeen Angus), foi verificado que, entre os três microssatélites testados e que obtiveram maior variabilidade, o marcador TGLA122 apresentou dois alelos ainda não descritos, sugerindo a participação de genes zebuínos na população estudada. De acordo com os autores, apesar do alto polimorfismo e dos altos níveis de diversidade intrapopulacional apresentados por este microssatélite, ele é eficiente na construção de filogenia de bovinos (ALMEIDA *et al.*, 2000).

Existem evidências de que o *Bos taurus* foi domesticado no noroeste da África e expandido para quase todas as partes do continente. O *Bos indicus*, ou zebu, foi originado no sul da Ásia e, atualmente, ocupa essa região. Eles também migraram extensivamente para o Oriente Próximo e para grandes áreas do leste, oeste e sul da África (FREEMAN *et al.*, 2006).

Segundo apresentado por Josahkian (2000) na seleção das raças zebuínas, no Brasil, três fases são facilmente identificadas, a partir da ênfase dada aos critérios seletivos.

1ª fase: caracterizada pela “pureza racial”. Esta fase se inicia com os primórdios do registro genealógico e vai até o início da década de 60. Ela é justificada pela necessidade de “separar o joio do trigo”, já que os traços étnicos eram, e ainda são, distintivos comerciais fortemente reconhecidos pelo mercado.

2ª fase: iniciada no final da década de 60 com a implantação das “Provas Zootécnicas”. O peso e ganho de peso são características eleitas e priorizadas durante esse período. Não havia muita preocupação com o tempo demandado para que os animais atingissem pesos recordes.

3ª fase: tendo início no final dos anos 80 e potencializada no início dos 90, é caracterizada pela necessidade de uma eficiente combinação entre tipo e função, com prevalência dos aspectos econômicos. Contribuiu para isso, a disponibilização de um material genético bem definido em termos de raças zebuínas, utilizando o melhoramento genético para características como carne e leite, tendência que permanece até os dias atuais.

2.2 Melhoramento genético

O melhoramento genético tem proporcionado avanços na obtenção de produtos de origem animal, principalmente pela seleção, cruzamentos entre raças, avaliação genética e orientação de acasalamentos entre animais com bom desempenho produtivo. O objetivo do melhoramento é o progresso genético de uma população, o qual se caracteriza por animais adaptados ao meio e que apresentam alta produtividade, o que ocorre principalmente pela seleção de touros. No entanto, seleção para características com baixa herdabilidade (como produção de leite) e características cuja abordagem na descendência é difícil, claramente justificam o teste de progênie (JOSAHKIAN, 2000).

Os microssatélites e o RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) são importantes marcadores na seleção animal e estão amplamente distribuídos pelos

cromossomos do genoma bovino. O uso destes marcadores combinado aos avanços nas biotécnicas de reprodução (inseminação artificial, maturação e fertilização *in vitro*, sexagem, etc.) oferece perspectivas promissoras no melhoramento animal, devido ao aumento da intensidade e precisão da seleção e na redução do intervalo entre gerações (BISHOP *et al.*, 1994).

2.3 Testes de verificação de parentesco

A tipagem sanguínea foi o primeiro teste para a verificação de parentesco em animais, surgindo por volta de 1938 e, por muitos anos, foi o único teste disponível, até que, recentemente, surgiram os testes de DNA como uma alternativa à tipagem sanguínea (OLIVEIRA & KUABARA, 2001).

2.3.1 Tipagem sanguínea

O teste de tipagem sanguínea consiste no reconhecimento dos diversos fatores sanguíneos presentes em um animal, realizado através de exame sorológico (baseado na reação antígeno/anticorpo) bem como das variantes protéicas, obtidas por eletroforese em gel de amido ou poliacrilamida. Os exames sorológicos baseiam-se na verificação de ocorrência de reações de hemólise ou aglutinação dos eritrócitos do animal em teste, quando submetidos à presença de anticorpos específicos para os diversos fatores sanguíneos. As principais variantes protéicas presentes nos eritrócitos ou no soro dos indivíduos são analisadas através de testes bioquímicos (OLIVEIRA & KUABARA, 2001).

Todos os testes de verificação de parentesco baseados em grupos sanguíneos e polimorfismos bioquímicos seguem o princípio da “Exclusão Genética”, ou seja, o objetivo do teste está em mostrar que um determinado animal não poderia ser o progenitor do animal em questão. Assim, comparando os resultados obtidos para o indivíduo em teste, nos exames sorológicos e para as variantes protéicas, com os resultados mostrados por seus progenitores, pode-se excluir um falso progenitor, sendo assim, a exatidão do teste de verificação de parentesco na exclusão é de 100%. Por outro lado, a não-exclusão somente, não é aceita como prova de parentesco pela relativa

baixa eficácia dos testes na comprovação do parentesco. Por isso, o suposto progenitor apenas pode ser “qualificado” como um possível progenitor (BERNOCO *et al.*, 1997).

Os grupos sanguíneos de bovinos despertam a atenção dos pesquisadores, tanto na área de Imunogenética, quanto no Melhoramento e na Produção Animal, devido à importância econômica desta espécie como fonte produtora de carne e leite.

Onze sistemas de grupos sanguíneos são conhecidos, em bovinos, entre os quais se distribuem mais de 90 diferentes fatores sanguíneos (Tabela 1). Em alguns sistemas de grupos sanguíneos, os fatores são herdados em combinações específicas (em blocos) e são transmitidos de geração para geração, sem sofrer qualquer alteração. Todo o produto deve receber, em cada sistema de grupos sanguíneos, uma combinação vinda do pai e outra da mãe. Por esse motivo, o teste de tipagem sanguínea, cuja eficácia reside exatamente na capacidade de poder detectar e excluir um falso pai (ou mãe), é eficiente em 98% dos casos. Ou seja, em 100 casos de verificação de parentesco, onde um falso pai esteja envolvido, 98 casos são resolvidos com a exclusão do falso progenitor (OLIVEIRA & KUABARA, 2001).

Tabela 1 – Sistemas de grupos sanguíneos em bovinos e seus respectivos fatores sanguíneos.

Sistema	Fatores Sanguíneos
A	A1, A2, D1, D2, D3, H, Z'
B	B1, B2, G1, G2, G3, I1, I2, K1, K2, O1, O2, O3, O4, O _x , P1, P2, Q1, Q2, T1, T2, T3, Y1, Y2, Y3, A'1, A'2, B', D'1, D'2, E'1, E'2, E'3, E'4, E' _x , F', G', I'1, I'2, J'1, J'2, K', O', P'1, P'2, Q', Y', A'', B'', F'', G'', I'', J''
C	C1, C2, C3, E1, E2, R1, R2, W1, W2, X1, X2, X3, C', L'1, L'2, C''
F	F1, F2, V1, V2, N'
J	J
L	L
M	M1, M2, M'
S	S, H', U1, U2, U', S'', H'', U''
Z	Z1, Z2
R'	R', S'
T'	T'

Adaptado de Oliveira & Kuabara, 2001.

A segurança do teste de tipagem sanguínea para verificação de parentesco é de 100%, desde que sejam feitos de acordo com as recomendações da ISAG (*International Society for Animal Genetics*), que propõe um painel de testes com pelo menos 60 diferentes anticorpos, pertencentes a, no mínimo, 10 sistemas de grupos sanguíneos (OLIVEIRA & KUABARA, 2001).

2.3.2 Tipagem por DNA

Embora o teste de tipagem sanguínea apresente alta precisão na exclusão de um falso parentesco, em alguns casos é necessária uma análise ainda mais precisa. Um exemplo dessa situação é o de uma égua portadora de quimerismo sanguíneo, excluída de ser mãe de um potro pelo exame de tipagem sanguínea. A exclusão persistiu após testar o DNA extraído do sangue desta fêmea para 5 microssatélites. No entanto, testando o DNA extraído de bulbo capilar nenhuma exclusão foi observada. Assim verificou-se que a égua era uma quimera, possuindo duas linhagens celulares distintas, sendo uma proveniente de seu irmão gêmeo (mostrada em seu sangue) e outra própria (evidenciada nos bulbos capilares) (BOWLING *et al.*, 1993).

A análise de DNA está sendo amplamente usada para confirmar a paternidade de novos registros de animais de raça e, esta verificação de *pedigrees* por DNA, está progressivamente substituindo os testes baseados em tipagem sanguínea, principalmente em áreas especializadas de criação de animais de raça, em especial no caso de bovinos, cavalos e cães. A aplicação da tecnologia de identificação de DNA em animais e na rastreabilidade da carne é uma extensão dos métodos básicos a uma nova área (CUNNINGHAM & MEGHEN, 2001).

Na União Européia, o monitoramento de doenças nacionais e programas de erradicação dependem muito da identificação animal convencional, usualmente com brincos (etiquetas de orelha). A proteção da integridade desses programas contra a fraude é vital. A tecnologia de identificação de DNA oferece um meio poderoso de autenticidade e controle desses sistemas convencionais de identificação animal. A seqüência de DNA é inalterável e presente em todas as partes do animal (CUNNINGHAM & MEGHEN, 2001).

Essa tecnologia pode ser usada por diversos motivos na área de identificação de animais vivos, como análise de paternidade e maternidade, erradicação e controle de doenças, amostragem sistemática de animais jovens e arquivamento de amostras e armazenamento do perfil de DNA dos animais em um banco de dados (CUNNINGHAM & MEGHEN, 2001).

Marcadores moleculares ou genéticos são seqüências de DNA regidas pela herança mendeliana simples e a análise de segregação destas requer a ocorrência de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no *locus*. Tais marcadores são instrumentos importantes para os estudos de populações e para a compreensão dos mecanismos de herdabilidade. O desenvolvimento de metodologias de análise molecular tem permitido a análise do genoma e das variações existentes tanto em regiões que codificam produtos gênicos, quanto naquelas cuja função permanece desconhecida, permitindo a rápida obtenção de mapas genéticos (identificação de determinados marcadores associados com ETL – *loci* de interesse econômico) para as mais diversas espécies, inclusive bovinos (COUTINHO & REGITANO, 2001).

Dentre os marcadores moleculares que podem ser usados em animais para determinação de perfil genético podemos destacar o RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) (MARSON *et al.*, 2005), o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (NAVE *et al.*, 1997), o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (APPA RAO *et al.*, 1996; SPRITZE *et al.*, 2003), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphysm*) (NIJMAN *et al.*, 1999; AJMONE-MARSAN *et al.*, 2002) e os microssatélites (HEYEN *et al.*, 1997; MATEUS *et al.*, 2004; METTA *et al.*, 2004).

A estratégia para a escolha de um novo teste de parentesco em animais deve ser a utilização de um teste que agregue as características da rotina do teste de tipagem sanguínea comprovadamente tão útil quanto este. As características essenciais são acurácia, efetividade e baixo custo, além de ser também importante o retorno rápido dos resultados, apresentar padrão de referência estabelecido e demonstrar facilidade de transferência de informações entre laboratórios. E ainda, o melhor processo não deve ser limitado ao sangue fresco e, para minimizar os custos, deve ser passível de automação (BOWLING, 2001).

Na literatura, encontram-se diferentes termos usados como sinônimos de microssatélites, tais como STR (*Short Tandem Repeats* ou *Simple Tandem Repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*) (TAMAKI & JEFFREYS, 2005; WITMER *et al.*, 2003). O termo microssatélite é atualmente utilizado em analogia ao termo minissatélite, que é empregado para definir repetições em *tandem* de seqüências com mais de 10 pares de bases (pb) (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

Microssatélites são pequenas séries de repetições de seqüências de DNA, compostas por até 6 pb em cada repetição, apresentando um total de, no máximo, aproximadamente 100 pb. A maioria das variações de microssatélites, em animais, é baseada em repetições dinucleotídicas, sendo CA (citosina-adenina) a mais comum. Estas variações, úteis para o objetivo de identificação, são causadas por uma mutação natural. Por causa da sua composição na seqüência, os microssatélites estão sujeitos a um deslizamento (*slippage*) que leva a um deficiente alinhamento durante replicação ou reparação do DNA. Normalmente, uma mutação leva a um pequeno aumento ou diminuição no número total de unidades repetidas. Essas diferenças se acumulam por muitas gerações e resultam em diferentes indivíduos com diferentes variações nos microssatélites (CUNNINGHAM & MEGHEN, 2001). Normalmente, as seqüências se repetem de 5 a 30 vezes e muitos microssatélites podem ser eficientemente amplificados por PCR (TAMAKI & JEFFREYS, 2005).

Os microssatélites tornaram-se populares na década passada, tanto em animais como em humanos, por se mostrarem ferramentas moleculares extremamente versáteis. As aplicações relacionadas aos microssatélites variam desde sua utilização como marcadores genéticos de segmentos cromossômicos, passando pela identificação de indivíduos, até o rastreamento da história biológica das populações (CHAMBERS & MACAVOY, 2000).

As vantagens associadas aos microssatélites são a co-dominância (permitindo identificar os genótipos heterozigotos e homozigotos dos indivíduos analisados) e a facilidade de identificação pela PCR, o que torna possível a padronização dos protocolos entre laboratórios (HOPKINS *et al.*, 1999; BOWLING, 2001). A identificação dos produtos de PCR pode ser feita através de, pelo menos, três estratégias

diferentes: utilização de um dos iniciadores marcados com isótopo radioativo, coloração do gel por impregnação com prata e marcação de um dos iniciadores com fluorescência, seguido pela eletroforese capilar em analisador genético (COUTINHO & REGITANO, 2001).

Os microssatélites são encontrados em maior ou menor abundância nos genomas de praticamente todos os organismos estudados até o momento, onde são distribuídos aleatoriamente e apresentam tamanhos variáveis, formando *loci* genéticos altamente polimórficos (CHAMBERS & MACAVOY, 2000). Podemos ressaltar ainda que estes *loci* são conservados entre *pedigrees*, populações e, freqüentemente, entre espécies geneticamente relacionadas do mesmo gênero (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Eles estão preferencialmente localizados em regiões não-codificantes, mas quando se localizam em regiões codificadoras, limitam-se a repetições trinucleotídicas, as quais não alteram a ordem de leitura (DOKHOLYAN *et al.*, 2000; KATTI *et al.*, 2001).

Alguns estudos já foram publicados usando microssatélites específicos para bovinos (*Bos taurus*) em outras espécies, como carneiros (*Ovis aries*, DE GOTARI *et al.*, 1997), saolas (*Pseudoryx nghetinhensis*, NGUYEN *et al.*, 2005a), iaques suíços (*Poephagus grunniens*, NGUYEN *et al.*, 2005b), búfalos africanos (*Syncerus caffer*, VAN HOOFT *et al.*, 1999) e em zebus (*Bos indicus*, MUKESH *et al.*, 2004).

Conforme citado anteriormente, a tipagem sanguínea em animais está, gradativamente, sendo substituída pela tipagem de DNA usando microssatélites por vários motivos. Entre eles, pode-se citar alguns casos de identificação individual ou de definição de parentesco que não são resolvidos por tipagem sanguínea. Além disso, a tipagem de DNA utilizando a técnica de microssatélites não necessita de grandes quantidades de material biológico, apresenta maior exatidão quando comparando com testes de tipagem sanguínea, não restringe o tipo de tecido a ser analisado, podendo ser utilizados, além de sangue e sêmen congelado, tecidos degradados, pêlos, ossos e dentes em alguns casos (BOWLING *et al.*, 1997). Assim, a possibilidade de extração de DNA de diferentes tecidos e, destes, em diferentes estados de conservação proporciona amplas possibilidades de aplicação dos testes de identificação genética.

2.4 Identificação dos genomas bovino e zebuino

O mapeamento do genoma de animais domésticos é o foco de muitos pesquisadores na última década, resultando no desenvolvimento de um mapa genético para bovinos e o seu uso, por exemplo, para identificar segmentos cromossômicos que determinam características de produção. Variações em genes individuais têm um impacto maior nos fenótipos do gado bovino, mas a maioria dos *loci* permanece desconhecida, exceto por sua posição aproximada no genoma bovino e o relativo impacto de tal variação na característica fenotípica desses animais (SMITH *et al.*, 2003).

Alguns estudos já foram publicados em relação ao desenvolvimento do genoma bovino com diferentes números de marcadores polimórficos, tais como 295 (FRIES, 1993), 313 (BISHOP *et al.*, 1994), 1250 (KAPPES *et al.*, 1997), 3960 (IHARA *et al.*, 2004). Sua eficiência elevada está relacionada com a alta variabilidade polimórfica aliada aos resultados de interpretação clara. Desta forma, os microssatélites foram propostos como marcadores para verificação e determinação de parentesco em rebanhos bovinos e em identificação individual de animais.

Na tentativa de estimar distâncias genéticas entre marcadores co-informativos e organizar grupos de ligação dentro dos *loci*, 290 marcadores microssatélites, 3 RFLP, 4 SSCP (*single-strand-conformational-polymorphisms*), 9 polimorfismos de antígenos eritrocitários e 7 de proteínas do soro foram integrados, dentro do mapa do genoma bovino, promovendo um sistema inicial no qual modelos de marcadores informativos podem ser selecionados para identificar ETL em qualquer raça ou raças cruzadas (BISHOP *et al.*, 1994).

Um outro mapa de ligação de bovinos foi construído com 1250 marcadores polimórficos, sendo 1236 microssatélites e 14 antígenos eritrocitários e proteínas do soro. Esse mapeamento fornece um número de marcadores suficientes para utilização em varreduras genômicas de populações que segregam *loci* quantitativos de característica (QTL) e implementação subsequente de seleção assistida por marcador (MAS) para programas de monta controlada (KAPPES *et al.*, 1997).

Mais recentemente, um mapa genético bovino de alta densidade, baseado em microssatélites, foi construído com a finalidade de mapear QTL. Esse mapa consiste de 3960 marcadores, incluindo 3802 microssatélites polimórficos (IHARA *et al.*, 2004).

Até o momento, não existe nenhum relato na literatura sobre o mapeamento do genoma de zebuínos.

2.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg segue um teorema formulado em 1908 e que tem o seguinte enunciado: “Em uma população infinitamente grande, em que os cruzamentos ocorrem ao acaso e sobre o qual não há atuação de fatores evolutivos, as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes ao longo das gerações” (BEIGUELMEN, 1995).

Uma população com essas características encontra-se em equilíbrio genético, o que é importante para estabelecer um modelo para o comportamento dos genes. Desse modo, é possível estimar frequências gênicas e genotípicas ao longo das gerações e compará-las com as obtidas na prática. Se os valores observados são significativamente diferentes dos valores esperados, pode-se concluir que fatores evolutivos estão atuando sobre essa população e que ela está evoluindo. Se os valores observados não diferem significativamente pode-se concluir que a população está em equilíbrio e que a frequência de cada gene não sofre alterações ao longo das gerações (BEIGUELMEN, 1995).

2.6 Variabilidade genética

As estimativas de heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) são calculadas para estimar a extensão da variabilidade genética em uma população, em cada marcador, o que contribui para a identificação dos marcadores moleculares de maior variabilidade e, conseqüentemente, mais adequados para identificação genética. A H_o é calculada a partir da contagem direta dos alelos heterozigotos na amostra analisada, enquanto que a H_e é calculada a partir das frequências alélicas observadas. Uma discrepância entre estes parâmetros para

determinado *locus* reflete o desequilíbrio genotípico da amostra (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

O valor do conteúdo de informação polimórfica (PCI) é calculado visando a análise de cada *locus* quanto ao seu grau de importância em estudos de segregação (BOTSTEIN *et al.*, 1980). O PCI fornece uma estimativa do poder de discriminação de um *locus*, levando em consideração não apenas o número de alelos que são expressos mas também a frequência relativa desses alelos (SMITH *et al.*, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O estudo foi realizado com amostras de 65 animais de 4 raças zebuínas (Gir, Tabapuã, Nelore e Brahman) (Tabela 2). Todos os animais incluídos no presente trabalho são provenientes de propriedades indicadas pela Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ) e pertencem à espécie *Bos indicus* (zebu), puros de origem (PO) e registrados junto a essa Associação. As amostras foram coletadas em propriedades de criadores do Rio Grande do Sul e a distribuição dessas propriedades pode ser observada na Figura 1. Uma análise do *pedigree* de cada animal foi realizada antes do processamento das amostras biológicas para minimizar a inclusão de animais com elevado nível de parentesco (primeiro grau) na população.

Tabela 2 – Distribuição por raça dos animais incluídos no estudo.

Raça	Número de Animais	Percentual (%)
Gir	19	29,2
Tabapuã	16	24,6
Nelore	15	23,1
Brahman	15	23,1
Total	65	100,0

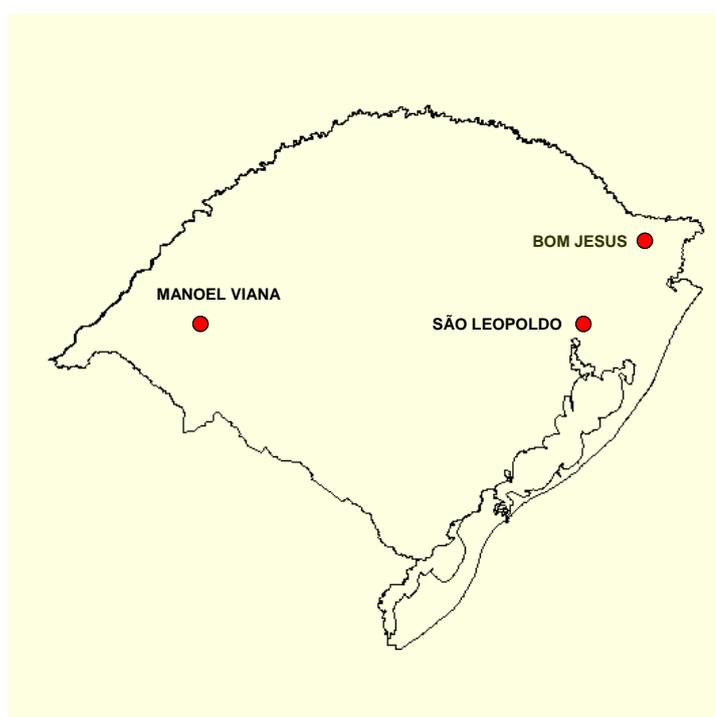


Figura 1 – Distribuição da localização das propriedades.

3.2 Coleta das amostras

As amostras de sangue periférico foram coletadas da veia jugular ou da veia caudal com seringa estéril descartável e aplicadas em papel filtro (Figura 2) para posterior análise.



Figura 2 – Representação da aplicação do sangue em papel filtro.

3.3 Extração de DNA das amostras

A extração de DNA, a partir do sangue aplicado em papel filtro, foi realizada utilizando o “kit” comercial *DNA IQ™ SYSTEM* (Promega®), conforme o protocolo abaixo.

3.3.1 Protocolo adaptado

- Cortar um círculo de 1,2mm de diâmetro da amostra do papel filtro;
- Colocar o círculo em um microtubo cônico de polipropileno de 1,5ml e acrescentar 150µl do tampão de lise (no momento do uso, adicionar 1µl de 1,4-ditiotreitol [DTT] para cada 100µl de solução de tampão de lise).
- Incubar o tubo a 95°C por 30 minutos;
- Adicionar 7µl da resina em suspensão na solução;
- Agitar a solução, no vortex, por 3 segundos;
- Deixar em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente;

- Agitar a solução, no vortex, por 2 segundos;
- Colocar o tubo imediatamente em estante magnética;
- Descartar o sobrenadante sem encostar na resina;
- Adicionar 100µl do tampão de lise à resina;
- Agitar a conteúdo do tubo, no vortex, por 2 segundos;
- Colocar o tubo imediatamente em estante magnética;
- Descartar o sobrenadante sem encostar na resina;
- Adicionar 100µl do tampão de lavagem 1X à resina;
- Agitar o conteúdo do tubo, no vortex, por 2 segundos;
- Colocar o tubo imediatamente em estante magnética;
- Descartar o sobrenadante sem encostar na resina;
- Repetir a última lavagem por mais duas vezes;
- Deixar o tubo aberto em estante magnética, por 5 minutos a temperatura ambiente, para secar a resina;
- Adicionar 75µl de tampão de eluição à resina;
- Agitar, no vortex, por 2 segundos;
- Incubar a 65°C por 5 minutos;
- Agitar o conteúdo do tubo, no vortex, por 2 segundos na velocidade máxima;
- Colocar o tubo imediatamente em estante magnética;
- Retirar cuidadosamente a solução contendo DNA e transferi-la para outro tubo, armazenando-a a -20°C até o momento da análise.

3.4 PCR Multiplex

As regiões de 11 *loci* de STR foram amplificadas utilizando o “kit” *StockMarks*[®] (Applied Biosystems[®]), o qual inclui os nove STR recomendados pela ISAG e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para identificação genética de bovinos (BM1824, BM2113, ETH10, ETH225, INRA023, SPS115, TGLA122, TGLA126 e TGLA227) e outros dois *loci* sugeridos pelas mesmas instituições, ETH3 e TGLA53. Esses marcadores estão listados na Tabela 3 e sua localização cromossômica está representada na Figura 3.

Tabela 3 – Lista de cada *locus* testado com sua localização cromossômica e tamanho dos alelos em bovinos.

Marcador STR	Cromossomo	Tamanho do produto de PCR (pb) ^a	Fluoróforo ^b	Coloração
BM1824	1	170-218	NED	Amarelo
BM2113	2	116-146	FAM	Azul
ETH10	5	198-234	FAM	Azul
ETH225	9	135-165	NED	Amarelo
ETH3	19	90-135	NED	Amarelo
INRA023	3	193-235	JOE	Verde
SPS115	15	235-265	FAM	Azul
TGLA122	21	134-193	JOE	Verde
TGLA126	20	104-131	JOE	Verde
TGLA227	18	64-115	FAM	Azul
TGLA53	16	147-197	FAM	Azul

^aAs faixas estimadas dos tamanhos dos alelos são baseadas em estudos de genotipagem realizados no Seqüenciador *ABI Prism 377 DNA*[®]. Estas faixas podem ser de 1 a 6 pb menor quando analisadas no Analisador Genético *ABI Prism 3100*[®]; ^bNED = nome protegido por patente, FAM = carboxifluoresceína, JOE = 2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxifluoresceína.

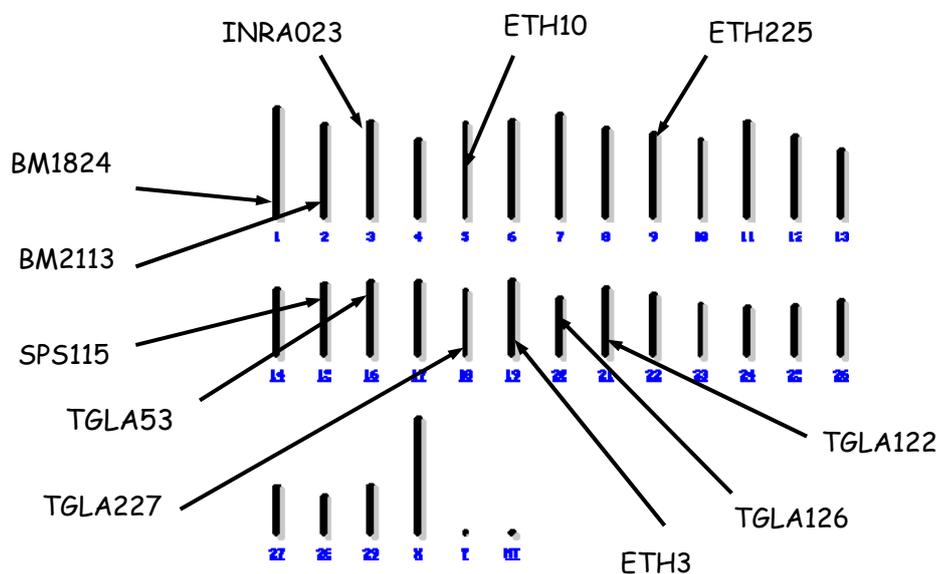


Figura 3 – Representação da localização dos marcadores no genoma bovino. Adaptado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=10708.

As reações de amplificação por PCR foram preparadas conforme o protocolo descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Protocolo para preparo da mistura dos reagentes do PCR.

Reagente	Volume por amostra (μl)
Tampão de PCR <i>StockMarks</i> (5X) *	1,5
Solução de dNTPs (1,25 mM)	2,0
DNA Polimerase (AmpliTaQ Gold) (5 U/ μl)	0,25
Oligonucleotídeos iniciadores	2,75
Solução de DNA (100 ng/ μl)	1,0
Volume Total	7,5

*Constituintes do tampão (5X): 250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3) e 12,5 mM MgCl₂.

As condições de amplificação usadas foram as seguintes:

- Desnaturação inicial: 15 minutos a 95°C
 - Desnaturação: 45 segundos a 94°C
 - Anelamento: 45 segundos a 61°C
 - Extensão: 1 minuto a 72°C
 - Extensão final: 60 minutos a 72°C
 - Passo final: 120 minutos a 25°C
- } 30 ciclos

Os produtos de PCR foram mantidos sob refrigeração até o momento de análise.

3.5 Análise e identificação dos fragmentos de DNA por eletroforese capilar

Os fragmentos gerados pelo PCR foram analisados por eletroforese capilar utilizando o analisador genético ABI *Prism* 3100 (Applied Biosystems®) e as amostras foram preparadas conforme especificações detalhadas na Tabela 5. Essas amostras foram submetidas a uma desnaturação durante 5 minutos a 95°C, seguido por um período de incubação de 5 minutos em banho de gelo. Os parâmetros para a realização da eletroforese capilar estão relacionados na Tabela 6.

Tabela 5 – Protocolo para preparo das amostras para eletroforese capilar.

Reagente	Volume por amostra (μl)
Formamida	11,5
Marcador Interno <i>Gene Scan-350 ROX</i> *	0,5
Alíquota do produto de PCR	1,0
Volume Total	13,0

* *ROX* = 6-Carboxi-X-rodamina.

Tabela 6 – Parâmetros de realização da eletroforese capilar no Analisador Genético ABI *Prism* 3100.

Parâmetro	Valor
Temperatura de eletroforese	60 °C
Corrente tolerada	100 µAmps
Corrente de eletroforese	100 µAmps
Voltagem tolerada	0,6 kVolts
Voltagem de pré- eletroforese	15 kVolts
Tempo de pré- eletroforese	180 segundos
Voltagem de injeção	1 kVolt
Tempo de injeção	22 segundos
Voltagem de eletroforese	15 kVolts
Tempo de aquisição de dados	1 segundo
Tempo de eletroforese	1500 segundos

Os dados dos tamanhos dos alelos foram obtidos a partir do programa *DataCollection*[®] v.1.1 e analisados através do programa *GeneScan*[®] v.3.7 (*Applied Biosystems*[®]).

A identificação dos tamanhos dos alelos foi realizada através do *Genotyper Software*[®] (*Applied Biosystems*[®]) com o auxílio de um algoritmo específico para análises de amostras bovinas (*CattleGT*[®]). Esse programa determina o alelo presente em cada *locus* utilizando como referência os tamanhos dos fragmentos conhecidos e encontrados no marcador interno *Gene Scan-350 ROX*. O tamanho dos alelos foi corrigido conforme os resultados obtidos simultaneamente na amostra controle de um bovino, fornecida pela ISAG.

3.6 Análises estatísticas

As frequências alélicas e as estimativas de variabilidade genética (heterozigidade observada - H_o , heterozigidade esperada - H_e e o conteúdo de informação polimórfica - PCI) foram obtidas utilizando o programa *Microsatellite Toolkit* versão 3.1 (disponível em <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) através do programa *GENEPOP* versão 3.4 (disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>).

A heterozigosidade esperada é dada pela fórmula:

$$H_e = 1 - \sum P_i^2, \text{ onde } P_i \text{ é a frequência do alelo } i.$$

E o conteúdo de informação polimórfica é calculado utilizando a fórmula:

$$P_{CI} = 1 - \sum_{i=1} P_i^2 - \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} P_i^2 P_j^2, \text{ onde } P_i \text{ e } P_j \text{ são as frequências dos alelos } i \text{ e } j$$

respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação dos STR em Zebuínos

Os resultados das análises laboratoriais foram obtidos conforme os eletroferogramas representados nas Figuras 4 e 5.

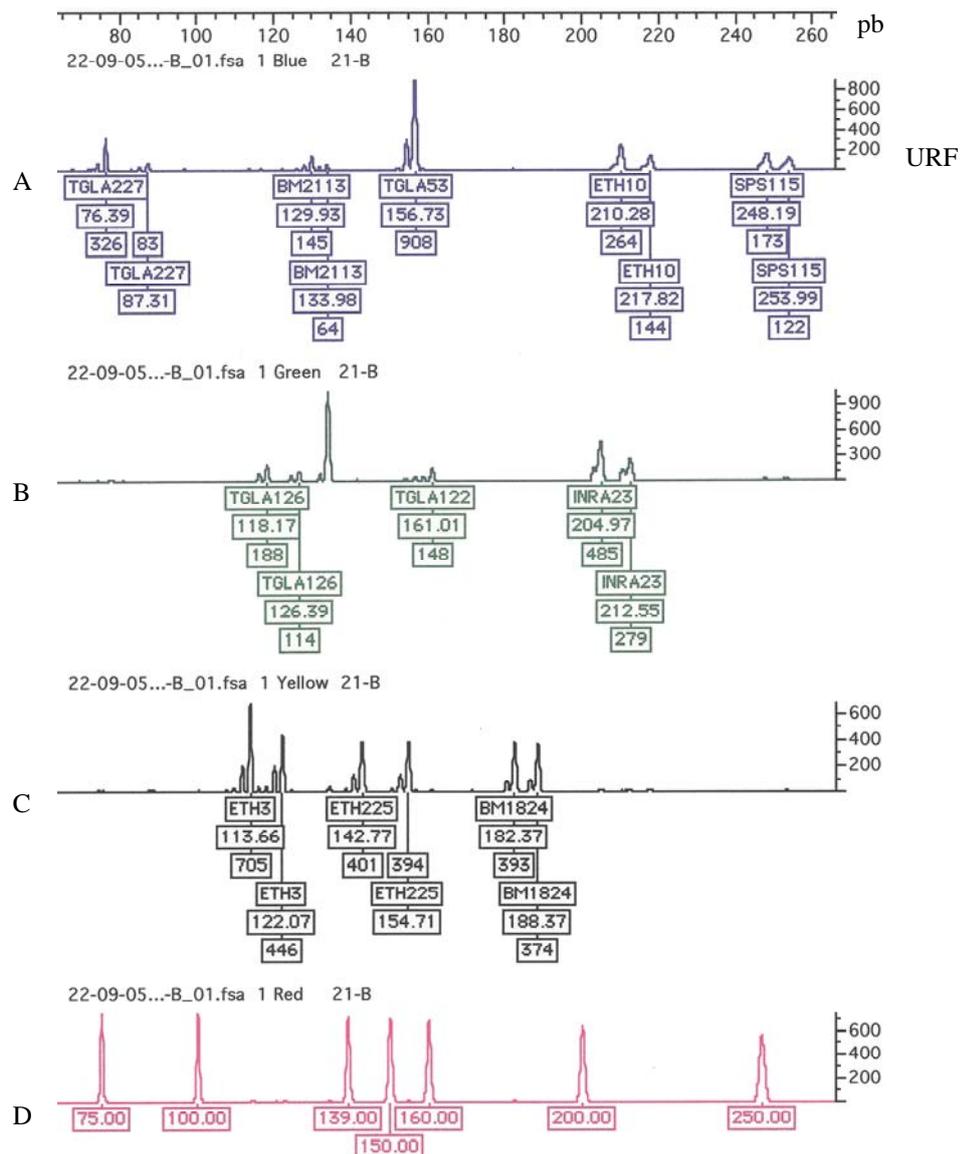


Figura 4 - Eletroferogramas dos onze *loci* utilizados neste estudo da amostra do animal controle. A) corresponde aos STR TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10 e SPS115; B) corresponde aos STR TGLA126, TGLA122 e INRA023; C) corresponde aos STR ETH3, ETH225 e BM1824; D) corresponde ao marcador interno. Pb = pares de bases e URF = Unidade Relativa de Fluorescência.

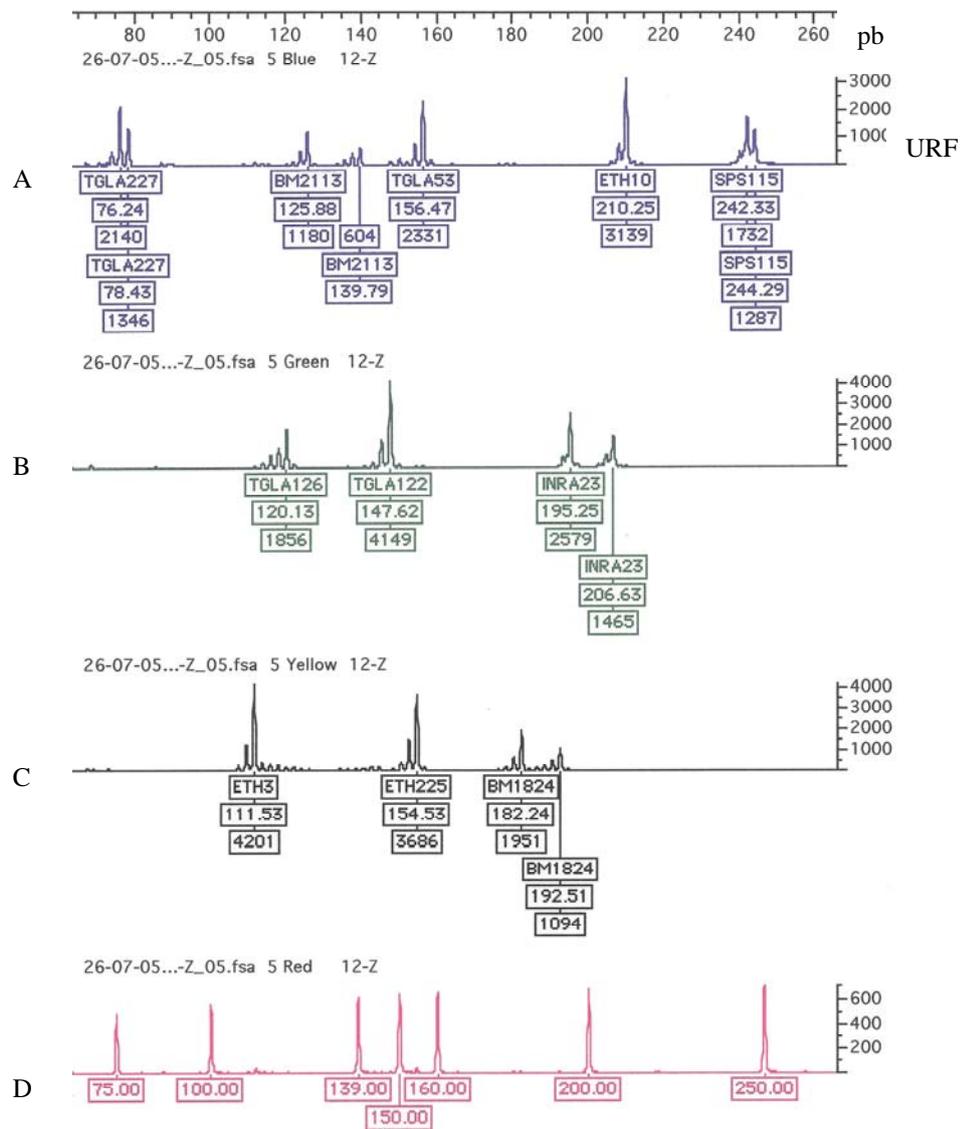


Figura 5 - Eletroferogramas dos onze *loci* utilizados neste estudo da amostra de um animal zebuino da raça Gir. A) corresponde aos STR TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10 e SPS115; B) corresponde aos STR TGLA126, TGLA122 e INRA023; C) corresponde aos STR ETH3, ETH225 e BM1824; D) corresponde ao marcador interno. Pb = pares de bases e URF = Unidade Relativa de Fluorescência.

4.2 Frequências Alélicas

Os resultados de todos os animais analisados estão compilados nas Tabelas 7, 8 e 9. Nessas tabelas estão representadas a quantidade absoluta da ocorrência dos alelos e

a frequência de cada alelo em cada marcador, analisados por raça e no total dos animais analisados.

Os alelos mais freqüentes no marcador BM1824, em toda amostra analisada, foram o 180 e o 182 (40,0% cada), cuja maior freqüência foi observada na raça Brahman (53,3%) para o alelo 180 e na raça Gir (55,3%) para o alelo 182.

Os alelos mais freqüentes no marcador BM2113, em toda amostra analisada, foram o 126 (22,7%), o 132 (19,5%) e o 138 (28,1%), cuja maior freqüência foi observada nas raças Gir (27,8%) e na raça Nelore (33,3%) para o alelo 126, nas raças Tabapuã (28,1%) e na raça Brahman (26,7%) para o alelo 132 e nas raças Tabapuã (40,6%) e na raça Brahman (46,7%) para o alelo 138.

Os alelos mais freqüentes no marcador ETH10, em toda amostra analisada, foram o 206 (36,3%) e o 210 (39,5%), cuja maior freqüência foi observada na raça Nelore (53,3%) para o alelo 206 e na raça Gir (65,8%) para o alelo 210.

O alelo mais freqüente no marcador ETH225, em toda amostra analisada, foi o 155 (82,0%) e todas as raças contribuíram com uma alta freqüência, sendo na raça Gir de 100%, pois em todos os animais analisados houve a amplificação deste alelo, na raça Tabapuã de 75,0%, na raça Nelore de 71,4% e na raça Brahman de 76,7%.

O alelo mais freqüente no marcador ETH3, em toda amostra analisada, foi o 112 (57,8%), cuja maior freqüência foi observada na raça Gir (65,8%) e na raça Tabapuã (62,5%).

O alelo mais freqüente no marcador INRA023, em toda amostra analisada, foi o 213 (38,5%), cuja maior freqüência foi observada na raça Gir (44,4%) e na raça Nelore (50,0%).

O alelo mais freqüente no marcador SPS115, em toda amostra analisada, foi o 242 (46,2%), cuja maior freqüência foi observada na raça Gir (52,9%), Tabapuã (50,0%) e na raça Nelore (54,2%).

O alelo mais freqüente no marcador TGLA122, em toda amostra analisada, foi o 150 (22,2%), cuja maior freqüência foi observada na raça Gir (33,3%) e na raça Brahman (30,0%).

O alelo mais freqüente no marcador TGLA126, em toda amostra analisada, foi o 124 (23,8%), cuja contribuição na maior freqüência foi observada na raça Brahman com 43,3%.

Tabela 7 – Distribuição e freqüência alélica dos marcadores BM1824, BM2113, ETH10 e ETH225.

Locus	RAÇAS								GERAL	
	GIR		TABAPUÁ		NELORE		BRAHMAN		Núm.	Freq.(%)
BM1824	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
178	3	7,9	4	12,5	6	20,0			13	10,0
180	10	26,3	12	37,5	14	46,7	16	53,3	52	40,0
181							1	3,3	1	0,8
182	21	55,3	10	31,3	9	30,0	12	40,0	52	40,0
183			2	6,3					2	1,5
188			1	3,1			1	3,3	2	1,5
190			2	6,3					2	1,5
192	3	7,9	1	3,1					4	3,1
193	1	2,6							1	0,8
194					1	3,3			1	0,8
Total	38	100,0	32	100,0	30	100,0	30	100,0	130	100,0
BM2113	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
122					1	3,3			1	0,8
124							2	6,7	2	1,6
126	10	27,8	5	15,6	10	33,3	4	13,3	29	22,7
130	6	16,7							6	4,7
132	2	5,6	9	28,1	6	20,0	8	26,7	25	19,5
134	6	16,7			4	13,3			10	7,8
136	7	19,4					2	6,7	9	7,0
138	3	8,3	13	40,6	6	20,0	14	46,7	36	28,1
140	2	5,6	5	15,6	2	6,7			9	7,0
142					1	3,3			1	0,8
Total	36	100,0	32	100,0	30	100,0	30	100,0	128	100,0
ETH10	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
204			1	3,8					1	0,8
206	11	28,9	7	26,9	16	53,3	11	36,7	45	36,3
208	1	2,6	8	30,8	12	40,0	4	13,3	25	20,2
209	1	2,6	2	7,7					3	2,4
210	25	65,8	8	30,8	2	6,7	14	46,7	49	39,5
216							1	3,3	1	0,8
Total	38	100,0	26	100,0	30	100,0	30	100,0	124	100,0
ETH225	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
137			4	12,5					4	3,1
139					1	3,6			1	0,8
141					2	7,1			2	1,6
143			2	6,3	1	3,6	6	20,0	9	7,0
145			1	3,1			1	3,3	2	1,6
149					4	14,3			4	3,1
151			1	3,1					1	0,8
155	38	100,0	24	75,0	20	71,4	23	76,7	105	82,0
Total	38	100,0	32	100,0	28	100,0	30	100,0	128	100,0

Núm. = quantidade absoluta da ocorrência dos alelos; Freq. = freqüência de cada alelo.

Tabela 8 – Distribuição e frequência alélica dos marcadores ETH3, INRA023, SPS115 e TGLA122.

Locus	RAÇAS								GERAL	
	GIR		TABAPUA		NELORE		BRAHMAN			
	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
ETH3										
92			1	3,1					1	0,8
98	7	18,4	2	6,3	1	3,6	1	3,3	11	8,6
106			1	3,1					1	0,8
112	25	65,8	20	62,5	13	46,4	16	53,3	74	57,8
114	2	5,3	7	21,9	12	42,9	12	40,0	33	25,8
116					1	3,6	1	3,3	2	1,6
120			1	3,1					1	0,8
122					1	3,6			1	0,8
134	4	10,5							4	3,1
Total	38	100,0	32	100,0	28	100,0	30	100,0	128	100,0
INRA023										
193					1	3,6			1	0,8
195	3	8,3	6	21,4			1	3,3	10	8,2
197	3	8,3			1	3,6	2	6,7	6	4,9
201					3	10,7	1	3,3	4	3,3
203			1	3,6	2	7,1	3	10,0	6	4,9
205			2	7,1					2	1,6
207	5	13,9	3	10,7	3	10,7	4	13,3	15	12,3
209	6	16,7	7	25,0	4	14,3	6	20,0	23	18,9
212	1	2,8					4	13,3	5	4,1
213	16	44,4	9	32,1	14	50,0	8	26,7	47	38,5
215	2	5,6					1	3,3	3	2,5
Total	36	100,0	28	100,0	28	100,0	30	100,0	122	100,0
SPS115										
240	9	26,5	2	11,1	3	12,5	7	25,0	21	20,2
242	18	52,9	9	50,0	13	54,2	8	28,6	48	46,2
243			2	11,1					2	1,9
244	7	20,6	1	5,6	1	4,2	8	28,6	17	16,3
248					1	4,2	1	3,6	2	1,9
250			2	11,1	5	20,8	3	10,7	10	9,6
252							1	3,6	1	1,0
254					1	4,2			1	1,0
256			2	11,1					2	1,9
Total	34	100,0	18	100,0	24	100,0	28	100,0	104	100,0
TGLA122										
134					1	4,2	1	3,3	2	2,8
140					5	20,8	5	16,7	10	13,9
142			1	8,3			4	13,3	5	6,9
145					1	4,2			1	1,4
148			4	33,3			5	16,7	9	12,5
150	2	33,3	1	8,3	4	16,7	9	30,0	16	22,2
152	2	33,3	1	8,3	6	25,0	4	13,3	13	18,1
156							2	6,7	2	2,8
158			2	16,7	3	12,5			5	6,9
160			3	25,0	4	16,7			7	9,7
192	2	33,3							2	2,8
Total	6	100,0	12	100,0	24	100,0	30	100,0	72	100,0

Núm. = quantidade absoluta da ocorrência dos alelos; Freq. = frequência de cada alelo.

O alelo mais frequente no marcador TGLA227, em toda amostra analisada, foi o 76 (67,1%), cuja maior frequência foi observada na raça Gir (61,1%), na raça Tabapuã (66,7%) e na raça Nelore (71,4%). Na raça Brahman, não houve amplificação de nenhum alelo deste marcador.

O alelo mais frequente no marcador TGLA53, em toda amostra analisada, foi o 157 (64,7%), cuja maior frequência foi observada na raça Nelore (86,7%) e na raça Brahman (73,3%).

Tabela 9 - Distribuição e frequência alélica dos marcadores TGLA126, TGLA227 e TGLA53.

Locus	RAÇAS								GERAL	
	GIR		TABAPUÁ		NELORE		BRAHMAN			
TGLA126	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
110	2	6,3	1	3,1					3	2,5
114							1	3,3	1	0,8
116	3	9,4	6	18,8	7	25,0	5	16,7	21	17,2
118	1	3,1	7	21,9			3	10,0	11	9,0
120	14	43,8	1	3,1	4	14,3	2	6,7	21	17,2
122			11	34,4	6	21,4	1	3,3	18	14,8
124	9	28,1	1	3,1	6	21,4	13	43,3	29	23,8
126	3	9,4	4	12,5	5	17,9	5	16,7	17	13,9
130			1	3,1					1	0,8
Total	32	100,0	32	100,0	28	100,0	30	100,0	122	100,0
TGLA227	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
76	11	61,1	16	66,7	20	71,4			47	67,1
78	3	16,7	6	25,0	8	28,6			17	24,3
79	2	11,1							2	2,9
82			1	4,2					1	1,4
84			1	4,2					1	1,4
94	1	5,6							1	1,4
98	1	5,6							1	1,4
Total	18	100,0	24	100,0	28	100,0	0	0,0	70	100,0
TGLA53	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)	Núm.	Freq.(%)
153	1	3,1							1	0,9
155	3	9,4							3	2,6
157	14	43,8	13	54,2	26	86,7	22	73,3	75	64,7
159	2	6,3	7	29,2					9	7,8
161	8	25,0			1	3,3	4	13,3	13	11,2
163			2	8,3					2	1,7
165	2	6,3			3	10,0	3	10,0	8	6,9
185							1	3,3	1	0,9
189			2	8,3					2	1,7
193	2	6,3							2	1,7
Total	32	100,0	24	100,0	30	100,0	30	100,0	116	100,0

Núm. = quantidade absoluta da ocorrência dos alelos; Freq. = frequência de cada alelo.

Ao analisar os *loci* estudados pode-se verificar que apenas 4 dos 11 STR estão em equilíbrio de H-W (BM1824, ETH3, INRA023 e TGLA227), em toda amostra analisada. Entretanto, o número de STR em equilíbrio aumenta quando foram analisados os resultados por raça. Na raça Gir, 7 marcadores estão em equilíbrio (BM1824, ETH10, ETH3, INRA023, TGLA122, TGLA126 e TGLA227); na Tabapuã, 7 (BM2113, ETH10, ETH225, ETH3, INRA023, TGLA126 e TGLA227); na Nelore, 8 (BM1824, BM2113, ETH10, ETH3, SPS115, TGLA126, TGLA227 e TGLA53) e, nos marcadores analisados da raça Brahman, todos estão em equilíbrio (com exceção do marcador TGLA227, pois não foram obtidos produtos de amplificação em nenhuma amostra nesta raça).

4.3 Variabilidade genética

Os índices de variabilidade genética (heterozigosidade observada - H_o , heterozigosidade esperada - H_e e o conteúdo de informação polimórfica - PCI), além da faixa de tamanho dos alelos e do número de alelos observados em cada marcador foram analisados em todas as raças e na amostra como um todo. Esses dados estão compilados na Tabela 10.

Um total de 100 diferentes alelos foram identificados entre os 11 STR nas 4 raças zebuínas. O número de alelos observados por marcador variou de 1 (ETH225) na raça Gir a 9 (INRA023) na Brahman, e de 6 (ETH10) a 11 (TGLA122 e INRA023) em toda amostra analisada. Os valores para este parâmetro em cada raça variam de 1 (ETH225) a 7 (BM2113, INRA023 e TGLA53) na raça Gir, de 4 (BM2113, TGLA227 e TGLA53) a 8 (TGLA126) na raça Tabapuã, de 2 (TGLA227) a 7 (BM2113, INRA023 e TGLA122) na raça Nelore e de 3 (ETH225) a 9 (INRA023) na raça Brahman. A média do número de alelos observados por *locus* foi estimada em 4,7 na raça Gir, 5,5 na Tabapuã, 4,9 na Nelore, 4,8 na Brahman e 9,1 em toda amostra analisada.

Os valores de H_o foram menores que os valores de H_e na maioria dos marcadores analisados por raça e em todos os marcadores, quando analisada toda a amostra. O valor médio da H_o variou de 0,43 (Gir) a 0,56 (Brahman) e o valor médio da H_e variou de 0,60 (Brahman) a 0,69 (Tabapuã) por raça. A H_o e H_e em toda amostra analisada foi 0,52 e 0,67, respectivamente.

O valor do PCI, na raça Gir, variou de 0,00 (ETH225) a 0,79 (BM2113). O valor do PCI, na raça Tabapuã, variou de 0,39 (ETH225) a 0,75 (TGLA122 e TGLA126). O valor do PCI, na raça Nelore, variou de 0,22 (TGLA53) a 0,79 (TGLA122). O valor do PCI, na raça Brahman variou de 0,32 (ETH225) a 0,82 (INRA023). Em toda amostra analisada, o valor do PCI variou de 0,31 (ETH225) a 0,85 (TGLA122). O valor médio do PCI variou de 0,53 (Brahman) a 0,62 (Tabapuã) por raça e foi 0,63 em toda amostra analisada.

Tabela 10 – Representação dos índices de variabilidade genética, faixa de tamanho e número de alelos observados nos 11 STR analisados.

Locus	Faixa de tamanho (pb)	GIR (n = 19)				TABAPUÃ (n = 16)				NELORE (n = 15)				BRAHMAN (n = 15)				TOTAL (n = 65)			
		Alelos Obs.	Ho	He	PCI	Alelos Obs.	Ho	He	PCI	Alelos Obs.	Ho	He	PCI	Alelos Obs.	Ho	He	PCI	Alelos Obs.	Ho	He	PCI
BM1824	178-194	5	0,58	0,63	0,56	7	0,50	0,76	0,70	4	0,73	0,67	0,59	4	0,67	0,57	0,46	10	0,62	0,67	0,61
BM2113	122-142	7	0,56	0,84	0,79	4	0,81	0,73	0,66	7	0,73	0,81	0,75	5	0,80	0,71	0,64	10	0,72	0,82	0,79
ETH10	204-216	4	0,37	0,50	0,41	5	0,77	0,76	0,68	3	0,67	0,57	0,46	4	0,53	0,65	0,56	6	0,56	0,68	0,61
ETH225	137-155	1	0,00	0,00	0,00	5	0,44	0,43	0,39	5	0,07	0,48	0,43	3	0,20	0,38	0,32	8	0,17	0,32	0,31
ETH3	92-134	4	0,68	0,53	0,48	6	0,44	0,57	0,51	5	0,71	0,62	0,52	4	0,53	0,57	0,46	9	0,59	0,60	0,54
INRA023	193-215	7	0,72	0,80	0,71	6	0,57	0,80	0,74	7	0,57	0,72	0,67	9	0,80	0,86	0,82	11	0,67	0,79	0,76
SPS115	240-256	3	0,47	0,63	0,54	6	0,33	0,74	0,67	6	0,58	0,67	0,60	6	0,86	0,79	0,72	9	0,58	0,72	0,67
TGLA122	134-192	3	0,00	0,80	0,59	6	0,33	0,85	0,75	7	0,42	0,86	0,79	7	0,67	0,84	0,79	11	0,47	0,87	0,85
TGLA126	110-130	6	0,50	0,73	0,66	8	0,81	0,80	0,75	5	0,71	0,82	0,76	7	0,73	0,77	0,71	9	0,69	0,84	0,81
TGLA227	76-98	5	0,44	0,68	0,61	4	0,50	0,51	0,43	2	0,29	0,42	0,33	-	-	-	-	7	0,40	0,51	0,46
TGLA53	153-193	7	0,38	0,75	0,69	4	0,08	0,63	0,55	3	0,13	0,25	0,22	4	0,33	0,45	0,40	10	0,24	0,56	0,54
Média		4,7	0,43	0,62	0,55	5,5	0,51	0,69	0,62	4,9	0,51	0,63	0,56	4,8	0,56	0,60	0,53	9,1	0,52	0,67	0,63

pb = pares de bases; n = número de amostras analisadas; Ho = heterozigidade observada; He = heterozigidade esperada; PCI = conteúdo de informação polimórfica.

Observação: Esta tabela é melhor visualizada na orientação paisagem.

5 DISCUSSÃO

O estudo realizado demonstrou que o uso de marcadores do tipo STR para identificação genética de bovinos permite identificar alelos em amostras de zebuínos. Os resultados desta metodologia foram demonstrados nas Figuras 4 e 5.

O conjunto de publicações sobre a expressão de marcadores moleculares para identificação genética em zebuínos é muito restrito. Alguns trabalhos realizam análises com um painel de marcadores moleculares diferente do utilizado neste trabalho (MACHUGH *et al.*, 1997, LOFTUS *et al.*, 1999 e MUKESH *et al.*, 2004). Desta forma, não estão disponíveis na literatura dados que possam ser comparados diretamente com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que o painel de marcadores moleculares adotado neste estudo inclui marcadores que não foram utilizados pelos trabalhos publicados. Além disso, os trabalhos publicados sobre identificação genética de zebuínos não fornecem os dados de frequências alélicas por eles encontrados (MACHUGH *et al.*, 1997 e MUKESH *et al.*, 2004). Desta forma, as frequências alélicas dos marcadores moleculares descritas neste estudo deverão ser confirmadas com estudos mais abrangentes, onde um número maior de animais e diferentes regiões deverão ser estudados.

Um total de 100 diferentes alelos foi identificado entre os 11 STR analisados, com uma média de 9,1 alelos por *locus*. Os outros estudos realizados com amostras de animais das raças zebuínas encontraram uma média de 8,3 (MUKESH *et al.*, 2004), 8,4 (MACHUGH *et al.*, 1997) e 11,4 (LOFTUS *et al.*, 1999) alelos por *locus* e com iaques suíços, a média foi 7,3 alelos por *locus* (NGUYEN *et al.*, 2005b). Esses estudos utilizaram uma população maior que a população do presente trabalho e um maior número de *locus*, mas o resultado obtido, nesse estudo, é menor do que o obtido no estudo de Loftus e colaboradores (1999) e maior dos que os estudos publicados por Mukesh e colaboradores (2004), MacHugh e colaboradores (1997) e Nguyen e colaboradores (2005b).

Marcadores que não se encontram em equilíbrio de H-W foram observados em 3 das 4 raças analisadas. Estes resultados são condizentes com os observados por outros

autores em raças isoladas e geneticamente estruturadas e podem estar evidenciando os sistemas de seleção praticados (LOFTUS *et al.*, 1999). Mas é importante considerar que esses resultados podem estar evidenciando o limitado número de amostras em cada raça. Uma avaliação mais abrangente na população de zebuínos do sul do Brasil seria necessária para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelo desequilíbrio de H-W encontrado.

A maioria das faixas de tamanho dos alelos, observada nos marcadores analisados, variou entre 12 a 22 pb, exceto para os marcadores ETH3, TGLA122 e TGLA53, que apresentaram faixas mais amplas de variação (42, 58 e 40 pb, respectivamente). Dentre os 11 STR analisados, 4 deles (BM2113, ETH225, TGLA126 e TGLA227) foram também estudados por outros grupos. A faixa de tamanho dos alelos nos marcadores BM2113 e ETH225 (20 e 18 pb, respectivamente) foi semelhante aos estudos de MacHugh e colaboradores (1997) e Van Hooft e colaboradores (1999). Entretanto, a variação observada na população estudada, nesse trabalho, nos marcadores TGLA126 e TGLA227 (20 e 22 pb, respectivamente) foi mais ampla que a variação observada no estudo de Van Hooft e colaboradores (1999). Essa variação pode indicar uma maior heterogeneidade da amostra analisada, quando comparada com os estudos publicados previamente, os quais estudaram populações bovinas e zebuínas da África, Europa e da Ásia e de búfalos africanos.

A H_e é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no *locus* testado em um sistema multilocus (FREEMAN *et al.*, 2006). O valor da H_e foi relativamente alto ($> 0,5$) na população analisada e na análise por raça. Estes dados indicam alto grau de diversidade genética nas diferentes raças. Neste sentido, a raça Brahman apresentou a menor diversidade (0,60) e a raça Tabapuã, a maior (0,69). Os valores da H_o em todas as 4 raças e em toda amostra analisada foram menores do que os valores da H_e , embora tenham sido observadas variações nos valores da H_o tanto entre as raças como entre os marcadores. Estes dados confirmam os resultados obtidos previamente em uma população zebuína e podem ser atribuídos ao limitado tamanho da população (MUKESH *et al.*, 2004).

O valor médio do PCI, em quase todos os marcadores, foi alto ($>0,5$), a exceção dos marcadores ETH225 e TGLA227. Este resultado foi diferente do resultado de um recente estudo realizado por Nguyen e colaboradores (2005b) com 51 iaques suíços, que encontrou valores altos do PCI para os marcadores ETH225 e TGLA227 e valores baixos para os marcadores ETH3 e INRA023. Além disso, para o marcador ETH225, não houve variação do conteúdo de informação polimórfica, visto que em todas as amostras houve a amplificação de um único alelo.

De uma forma geral, os *loci* estudados foram mais polimórficos (maior valor médio da He e do PCI) nas raças Tabapuã e Nelore. Estes dados sugerem que, nestas raças, os marcadores analisados tenham utilidade em avaliações de biodiversidade (MUKESH *et al.*, 2004). O alto número de *loci* polimórficos confirma a utilidade e importância dos STR em estudos de relação e variabilidade genética e é condizente com um estudo semelhante realizado com iaques suíços (NGUYEN *et al.*, 2005b).

No marcador TGLA227, não foram observados produtos de amplificação na raça Brahman. Este dado pode ser atribuído à ausência de homologia das seqüências nucleotídicas dos oligonucleotídeos iniciadores nos animais desta raça e estão de acordo com outros estudos realizados com saolas e iaques suíços por Nguyen e colaboradores (2005a e 2005b), onde também encontraram 4 e 6 *loci* não amplificados nestas espécies, respectivamente. No entanto, vale destacar que esta afirmação poderia ser confirmada, se o número de indivíduos estudados, da raça Brahman, fosse maior.

A alta heterozigosidade na maioria dos *loci* analisados indica que estes *loci* possuem um alto poder de discriminação individual, principalmente nas raças Tabapuã e Nelore, sugerindo um alto potencial para utilização do conjunto multiplex em testes de identidade genética e determinação de parentesco.

6 CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido demonstrou que é possível utilizar um conjunto de 11 marcadores moleculares desenvolvidos para a identificação genética de bovinos na identificação genética de zebuínos do estado do Rio Grande do Sul.

A frequência alélica dos marcadores moleculares, utilizados no presente estudo, foi estabelecida nas 4 raças rebuínas (Gir, Tabapuã, Nelore e Brahman) incluídas nesse estudo assim como na amostra total (sem subdividir por raça).

Os valores de variabilidade genética (heterozigosidade observada - H_o , heterozigosidade esperada - H_e e conteúdo de informação polimórfica - PCI) foram definidos para os diferentes marcadores moleculares utilizados nos animais das raças Gir, Tabapuã, Nelore e Brahman.

REFERÊNCIAS

- AJMONE-MARSAN, P.; NEGRINI, R.; MILANESI, E.; BOZZI, R.; NIJMAN, I.J.; BUNTJER, J.B.; VALENTINI, A.; LENSTRA, J.A. Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. **Animal Genetics**, v.33, p.280-286, 2002.
- ALMEIDA, S.E.M.; MACHADO, M.S.N.; STEIGLEDER, C.S.; GAMA, C.L.; HUTZ, M.L.; HENKES L.E.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A. Genetic diversity in a Brazilian bovine herd base don four microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.2, p.347-350, 2000.
- APPA RAO, K.B.C.; BHAT, K.V.; TOTEY, S.M. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v.13, p.135-138, 1996.
- BEIGUELMAN, B. A lei de Hardy e Weinberg. In: BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. 2.ed. Ribeirão Preto: SBG, 1995. cap.7, p.179-202.
- BERNOCO, D.; OLIVEIRA, D.A.A.; KUABARA, M.Y. Análise de parentesco em cavalos de grupos sanguíneos e polimorfismos bioquímicos à tipagem por DNA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.4, p.38-44, 1997.
- BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; SUNDEN, S.L.F.; HAWKINS, G.A.; TOLDO, S.S.; FRIES, R.; GROSZ, M.D.; YOO, J.; BEATTIE, C.W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v.136, p.619-639, 1994.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BOWLING, A.T.; STOTT, M.L.; BICKEL, L. Silent blood chimaerism in a mare confirmed by DNA marker analysis of hair bulbs. **Animal Genetics**, v. 24, p.323-324, 1993.
- BOWLING, A.T.; EGGLESTON-STOTT, M.L.; BYRNS, G.; CLARK, R.S.; DILEANIS, S.; WICTUM, E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. **Animal Genetics**, v.28, p.247-252, 1997.
- BOWLING, A.T. Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. **Livestock Production Science**, v.72, p.111-116, 2001.
- BRADLEY, D.G.; MACHUGH, D.E.; CUNNINGHAM, P.; LOFTUS, R. Mitochondrial diversity and the origins of african and european cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.5131-5135, 1996.
- CAMINHAS, M.M.T.; BORTOLOZZI, J.; CHAMMA, O.S.; CURI, P.R. Grupos sanguíneos de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.8, p.1195-1200, 1992.

CERIOTTI, G.; CAROLI, A.; RIZZI, R.; CRIMELLA, C. Genetic relationships among taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations as revealed by blood groups and blood proteins. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.120, p.57-67, 2003.

CHAMBERS, G.K. & MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.126, p.455-476, 2000.

COUTINHO, L.L. & REGITANO, L.C.A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. cap 1, p.13-24.

CUNNINGHAM, E.P. & MEGHEN, C.M. Biological identification systems: genetic markers. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.20, n.2, p.491-499, 2001.

DE GOTARI, M.J.; FREKING, B.A.; KAPPES, S.M.; LEYMASTER, K.A.; CRAWFORD, A.M.; STONE, R.T.; BEATTIE, C.W. Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. **Animal Genetics**, v.28, p.274-290, 1997.

DOKHOLYAN, N.V.; BULDYREV, S.V.; HAVLIN, S.; STANLEY, H.E. Distributions of dimeric tandem repeats in non-coding and coding DNA sequences. **Journal of Theoretical Biology**, v.202, p.273-282, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Clases de marcadores moleculares para el análisis genético. In: FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. cap.1, p.15-68.

FREEMAN, A.R.; BRADLEY, D.G.; NAGDA, S.; GIBSON, J.P.; HANOTTE, O. Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. **Animal Genetics**, v.37, p.1-9, 2006.

FRIES, R. Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. **Animal Genetics**, v.24, p.111-116, 1993.

HANOTTE, O.; BRADLEY, D.G.; OCHIENG, J.W.; VERJEE, Y.; HILL, E.W.; REGE, J.E.O. African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. **Science**, v.296, p.336-339, 2002.

HEYEN, D.W.; BEEVER, J.E.; DA, Y.; EVERT, R.E.; GREEN, C.; BATES, S.R.E.; ZIEGLE, J.S.; LEWIN, H.A. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. **Animal Genetics**, v.28, p.21-27, 1997.

HOPKINS, M.S.; CASA, A.M.; WANG, T.; MITCHELL, S.E.; DEAN, R.E.; KOCHERT, G.D.; KRESOVICH, S. Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats. **Crop Science**, v.39, n.4, p.1243-1253, 1999.

IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K.; TAKEDA, H.; SUGIMOTO, M.; MIZOGUCHI, Y.; HIRANO, T.; ITOH, T.; WATANABE, T.; REED, K.M.; SNELLING, W.M.; KAPPES, S.M.; BEATTIE, C.W.; BENNETT, G.L.; SUGIMOTO, Y. A comprehensive genetic map of the cattle genome base don 3802 microsatellites. **Genome Research**, v.14, p.1987-1998, 2004.

JOSAHKIAN, L.A. Programa de melhoramento genético das raças zebuínas. **III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal**, p.76-93, 2000.

KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; McGRAW, R.A.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; BEATTIE, C.W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v.7, p.235-249, 1997.

KATTI, M.V.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, n.7, p.1161-1167, 2001.

LÔBO, R.N.B. Genetic parameters for reproductive traits of zebu cows in the semi-arid region of Brasil. **Livestock Production Science**, v.55, p.245-248, 1998.

LOFTUS, R.T.; MACHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G.; SHARP, P.M.; CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.2757-2761, 1994.

LOFTUS, R.T.; ERTUGRUL, O.; HARBA, A.H.; EL-BARODY, M.A.A.; MACHUGH, D.E.; PARK, S.D.E.; BRADLEY, D.G. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. **Molecular Ecology**, v.8, p.2015-2022, 1999.

MACHUGH, D.E.; SHRIVER, M.D.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v.146, p.1071-1086, 1997.

MARSON, E.P.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; BALIEIRO, J.C.C.; ELER, J.P.; FIGUEIREDO, L.G.G.; MOURÃO, G.B. Genetic characterization of european-zebu composite bovine using RFLP markers. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.3, p.496-505, 2005.

MATEUS, J.C.; PENEDO, M.C.T.; ALVES, V.C.; RAMOS, M.; RANGEL-FIGUEIREDO, T. Genetic diversity and differentiation in portuguese cattle breeds using microsatellites. **Animal Genetics**, v.35, p.106-113, 2004.

METTA, M.; KANGINAKUDRU, S.; GUDISEVA, N.; NAGARAJU, J. Genetic characterization of the indian cattle breeds, ongole and deone (*Bos indicus*), using microsatellite markers – a preliminary study. **BMC Genetics**, v.5, n.16, 2004.

MUKESH, M.; SODHI, M.; BHATIA, S.; MISHRA, B.P. Genetic diversity of indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.121, p.416-424, 2004.

NAVE, A.; KASHI, Y.; SOLLER, M. Minisatellite and microsatellite length variation at a complex bovine VNTR locus. **Animal Genetics**, v.28, p.52-54, 1997.

NGUYEN, T.T.; MÉNÉTREY, F.; GENINI, S.; NGUYEN, V.L.; VÖGELI, P.; NGUYEN, B.X.; STRANZINGER, G. Application of bovine microsatellite markers on saola (*Pseudoryx nghetinhensis*). **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.122, p.195-198, 2005a.

NGUYEN, T.T.; GENINI, S.; MÉNÉTREY, F.; MALEK, M.; VÖGELI, P.; GOE, M.R.; STRANZINGER, G. Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of swiss yak (*Poephagus grunniens*). **Animal Genetics**, v.36, p.484-489, 2005b.

NIJMAN, I.J.; BRADLEY, D.G.; HANOTTE, O.; OTSEN, M.; LENSTRA, J.A. Satellite DNA polymorphisms and AFLP correlate with *Bos indicus-taurus* hybridization. **Animal Genetics**, v.30, p. 265-273, 1999.

NOGUEIRA, G.P. Puberty in south american *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p.361-372, 2004.

OLIVEIRA, D.A.A. & KUABARA, M.Y. A genealogia, sua importância para o melhoramento e para a produção animal e os métodos de confirmação dos pedigrees. In: PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado a produção animal**. Belo Horizonte: Emater, 2001. p. 435-444.

RITZ, L.R.; GLOWATZKI-MULLIS, M-L.; MacHUGH, D.E.; GAILLARD, C. Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites. **Animal Genetics**, v.31, p.178-185, 2000.

SMITH, J.S.C.; CHIN, E.C.L.; SHU, H.; SMITH, O.S.; WALL, S.J.; SENIOR, M.L.; MITCHELL, S.E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays L.*): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.163-173, 1997.

SMITH, T.P.L.; THALLMAN, R.M.; CASAS,E.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Theory and application of genome-based approaches to improve the quality and value of beef. **Outlook on Agriculture**, v.32, n.4, p.253-265, 2003.

SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; McMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1157-1164, 2003.

TAMAKI, K. & JEFFREYS, A.J. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. **Legal Medicine**, v.7, p.244-250, 2005.

VAN HOOFT, W.F.; HANOTTE, O.; WENINK, P.W.; GROEN, A.F.; SUGIMOTO, Y.; PRINS, H.H.T.; TEALE,A. Applicability of bovine microsatellite markers for population genetic studies on african buffalo (*Syncerus caffer*). **Animal Genetics**, v.30, p.214-220, 1999.

WITMER, P.D.; DOHENY, K.F.; ADAMS, M.K.; BOEHM, C.D.; DIZON, J.S.; GOLDSTEIN, J.L.; TEMPLETON, T.M.; WHEATON, A.M.; DONG, P.N.; PUGH, E.W.; NUSSBAUM, R.L.; HUMTER, K.; KELMENSEN, J.A.; ROWE, L.B.; BROWNSTEIN, M.J. The development of a highly informative mouse simple sequence length polymorphism (SSLP) marker set and construction of a mouse family tree using parsimony analysis. **Genome Research**, v.13, p.485-491, 2003.

REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

<http://animalgenomics.ucd.ie/sdeparck/ms-toolkit>

<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=10708