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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aplicação marcadores moleculares para análise de diversidade genética no cromossoma Y de bovinos da raça Guzerá

ORIENTADA: Izinara Rosse da Cruz

ORIENTADORA: Maria Raquel Santos Carvalho

CO-ORIENTADOR: Roney Santos Coimbra

BELO HORIZONTE

Fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Aplicação de marcadores moleculares para análise de diversidade genética no cromossoma Y de bovinos da raça Guzerá

Izinara Rosse da Cruz

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Genética (Área de Concentração em Genética Molecular, de Microorganismos e Biotecnologia) da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe, Cirlene, e à minha irmã, Meiriele, por serem tão essenciais à realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Àquele que me deu a vida e que guia e protege os meus passos: Deus.

À minha orientadora, Profa. Drª Maria Raquel Santos Carvalho, pela atenção, disponibilidade e principalmente pelos ensinamentos que me permitiram esta conquista.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Roney Coimbra, por ter aceitado enfrentar conosco esse desafio, pela amizade e pelas mais sensatas contribuições.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite.

Aos professores e coordenadores da Pós-Graduação pela oportunidade e aprendizado e ao pessoal da secretaria por cuidarem da parte burocrática.

À Profa. Drª Vania Maldini Penna e Profa. Drª Maria Gabriela Peixoto, que contribuíram de forma grandiosa na finalização deste trabalho. Aos responsáveis pelas plataformas de sequenciamento da FIOCRUZ-MG, do Hermes Pardini, da Embrapa Milho e Sorgo e do Departamento de Genética do ICB, pela atenção dada às minhas corridas de fragmento.

Agradeço também ao Laborátorio de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, na pessoa do Dr. Marco Antônio Machado, por nos conceder as amostras de DNA.

Aos amigos antigos do LGHM, Flávia, Gutemberg e Sávio, que tão bem me acolheram, muito ensinaram e que deixaram saudades. À Ana Luiza, sempre decidida a me ajudar e que de forma alguma deixará de ser minha "filha" querida. Em especial à Latife, que me ensinou os primeiros passos na inciação científica.

Aos que considero meus irmãos científicos e que compartilham comigo os experimentos do dia-a-dia: Thiago, Lucimara, Gabrielle, Elisângela, Laura, Michelle, Natália, Pedro, Bárbara e Ana Cristina. À Marlene, de quem recebi o primeiro sorriso no laboratório e que é sempre tão amiga e prestativa. Ao aluno de iniciação científica, Pablo Fonseca, meu primeiro estagiário, pela dedicação e também pelos momentos de descontração.

Aos companheiros de mestrado Anderson, Patrícia, Roxana e Natália pela troca de experiência. À Janaina, pela amizade construída durante a mais pesada das disciplinas, mas que rende frutos

até hoje. E à Selma, vizinha, companheira de mestrado e futuramente de doutorado, pelas conversas e apoio mútuo.

Aos amigos do CEBio, minha mais nova família, que não medem esforços em me ajudar a entender os mistérios da bioinformática.

Ao Raphael pelos ensinamentos, amizade, e por ter sempre as palavras certas para me re-animar. Ao Pablo Couto, Renata e demais amigos de B.H., por todo apoio e carinho. Ao Ulisses, sempre pronto a me socorrer nos momentos mais difíceis e às amigas de república, Ana Virgínia e Gracielle, pelo convívio. Não podia deixar de agradecer ao Daniel Coelho, pela paciência, amizade e pelas horas de lazer tão necessárias.

Aos amigos do Anta Vesga, por serem responsáveis pelas idéias mais loucas e mais divertidas, pelas conversas inteligentes e os momentos mais felizes.

A todos os meus amigos de Maravilhas dos quais muito me afastei, mas que trago sempre no coração. À Amanda de Freitas, Amanda Valadares, e Fernanda pela torcida. À Nayana, para a qual não há palavras capazes de expressar minha gratidão por 17 anos de sincera amizade. E à minha grande amiga Lu, que não esquece de mim em suas orações.

Em especial, agradeço à todos os membros da minha família, pela união e apoio. À minha mãe, pelo amor incondicional, incentivo e dedicação; à minha querida irmã pela força e coragem que me dá todos os dias. E à minha tia Sandra, em quem me inspiro para correr atrás dos meus sonhos.

Agradeço também à CAPES, FAPEMIG, CNPQ e à Pós-Graduação em Genética, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conquista de mais esta etapa.

“Se você tem disposição para correr o risco, a vista do outro lado é espetacular.”

(Autor desconhecido)

Sumário

Lista de Figuras ix

Lista de Tabelas x

Lista de abreviaturas, siglas e unidades xi

RESUMO 12

ABSTRACT 13

1 INTRODUÇÃO 14

1.1 História dos zebuínos no Brasil 14

1.2 Programas de melhoramento genético 17

1.3 A diversidade genética do Guzerá 19

1.4 O cromossoma Y 21

1.5 Marcadores genéticos no cromossoma Y 22

1.6 Justificativa e relevância 27

1.7 Objetivos 29

1.7.1 Objetivo geral 29

1.7.2 Objetivos específicos 29

2 MATERIAIS E MÉTODOS 30

2.1 Amostra 30

2.2 Extração de DNA 30

2.3 Genotipagem dos loci microssatélites 30

2.4 Análises estatísticas 32

3 RESULTADOS 34

3.1 Seleção de marcadores moleculares e sua caracterização bioinformacional 34

3.2 Alelos 37

3.3 Frequências alélicas e haplotípicas 42

3.4 Haplótipos de cromossoma Y e produção leiteira 43

4 DISCUSSÃO 45

4.1 Sistemas haplotípicos para o cromossoma Y bovino 45

4.2 Diversidade genética 49

4.3 Análise das genealogias 50

4.3 Perspectivas 51

5 CONCLUSÕES 52

6 REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS E BIBLIOGRÁFICAS 53

7 ANEXOS 60

Lista de Figuras

Figura 1 – Touro da raça Guzerá. Édipo da Alagoinha. 16

Figura 2 – Estrutura do cromossoma Y de bovinos. 36

Figura 3 – Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando os picos correspondentes aos amplicons de 159 (alelo INRA189^{82pb}) e de 167 pb (alelo INRA189^{90pb}) 38

Figura 4 – Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando os picos correspondentes aos amplicons de 159 (alelo INRA189^{82pb}) e de 167 pb (alelo INRA189^{90pb}). 38

Figura 5 – Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando o pico correspondente ao amplicon de 167 pb (alelo INRA189^{90pb}) 39

Figura 6 – Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando os picos correspondentes aos amplicons de 159 (alelo INRA189^{82pb}) 39

Figura 7 – Eletroferograma do marcador microssatélite BYM-1 mostrando a amplificação do alelo de BYM-1^{260pb} 40

Figura 8 – Eletroferograma do marcador microssatélite BYM-1 mostrando o alelo BYM-1^{258pb} 40

Figura 9 – Eletroferograma do marcador microssatélite BM861 alelo BM861^{158pb} 41

Figura 10 – Eletroferograma do marcador microssatélite UMN0307, alelo UMN0307^{151pb} 41

Figura 11 - Gráfico de dispersão das DEPs para produção leiteira dos touros por haplótipo 44

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sequência de *primers* e temperatura para os marcadores microssatélites 32

Tabela 2 – Tamanho do fragmento para cada marcador e seu alelo correspondente, de acordo com a literatura 35

Tabela 3 – Indicadores de qualidade de amplificação 42

Tabela 4 – Haplótipos identificados em uma amostra dos principais reprodutores 43

Tabela 5 – Produção leiteira conforme haplótipo do cromossoma Y 43

Tabela 6 – Tamanhos alélicos descritos na literatura e observados no presente trabalho 48

Lista de abreviaturas, siglas e unidades

Item	**Definição**
µL	Microlitros
ABCZ	Associação Brasileira dos Criadores de Zebu
ACGB	Associação dos Criadores de Guzerá do Brasil
AZN	Arquivo Zootécnico Nacional
BLUP	*Best linear umbiased prediction*
cR	centiRays
DEP	Diferenças esperadas na progênie
DG	Diversidade gênica
DH	Diversidade haplotípica
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
FAO	*Food and Agriculture Organization of the United Nations*
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LGHM	Laboratório de Genética Humana e Médica
MOET	*Multiple ovulation and embryo transfer* – Transferência embrionária com ovulação múltipla
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
ng	Nanogramas
PAR	Região pseudoautossômica
PCR	*Polimerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
PMGZ	Programa de Melhoramento Genético das raças Zebuínas
pb	Pares de base
pmol	Picomolar
TP	Teste de Progênie
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos de bovinos do mundo e é considerado o sexto maior produtor de leite mundial. O agronegócio do leite no país gera emprego e renda para mais de 3,6 milhões de pessoas e responde por 9% do PIB. Programas de melhoramento genético têm conseguido aumentar consideravelmente a produção leiteira dos rebanhos a partir de pequeno número de animais de maior valor genético para as características de interesse. Os touros com DEP elevada são intensivamente utilizados nos sistemas de reprodução assistida e muito pouco se sabe sobre o grau de diversidade genética ainda existente nos plantéis. Com o objetivo de analisar a diversidade genética dos touros da raça Guzerá avaliados nos programas de melhoramento genético da raça, uma amostra de 54 touros foi genotipada, utilizando-se quatro microssatélites Y-específicos INRA198, BYM-1, BM861 e UMN0307. Os microssatélites foram genotipados por amplificação por PCR e separação por eletroforese capilar. Frequências alélicas foram estabelecidas por contagem gênica. A diversidade haplotípica foi calculada com a fórmula de Nei. Os alelos identificados na raça foram INRA189^{82bp}, INRA189^{90pb}, UMN0307^{151pb}, BM861^{158pb}, BYM-1^{258pb}, BYM-1^{260pb}. O marcador INRA189 apresentou distúrbios de segregação e foi descartado da análise. O marcador BYM-1 foi bi-alélico e os demais foram monomórficos. Com base nos marcadores BYM-1, BM861 e UMN0307 foi possível identificar dois haplótipos. Os marcadores foram combinados em haplótipos (H1: UMN0307^{151pb}, BM861^{158pb}, BYM-1^{258pb} e H2: UMN0307^{151pb}, BM861^{158pb}, BYM-1^{260pb}). H1 foi o mais frequente, estando presente em 83% dos animais genotipados. A baixa diversidade haplotípica observada (0,28 ± 0,07) está de acordo com outros estudos na literatura, que também averiguaram pequeno número de haplótipos em raças zebuínas. Além disto, estudos de diversidade genética baseados na análise dos dados de registro genealógico da raça Guzerá no Brasil também indicam baixa diversidade genética e pequeno tamanho efetivo de população. Entretanto, estes resultados devem ser interpretados cautelosamente, uma vez que o sistema de haplotipagem precisa ser ampliado com a inclusão de mais marcadores genéticos.

ABSTRACT

Brazil has one at the largest cattle population in the world and is sthe sixth largest milk producer worldwide. Dairy agribusiness generates jobs and income for more than 3.6 million people in the country and accounts for 9% of national annual internal product. Breeding programs have been able to significantly increase milk production of herds based on a small number of animals with high genetic merit for traits of interest. Bulls with the highest DEP are extensively used in mating systems, and very little is known about the degree of genetic diversity still existing in the herds. In order to characterizing genetic diversity among Guzerat bulls evaluated the breeding programs for this breed in Brazil, a sample of 54 bulls were genotyped for the Y-chromosome specific microsatellites INRA198, BYM-1, BM861 e UMN0307. These genetic markers were genotyped by PCR amplification and capillary electrophoresis separation. Allele frequencies were obtained by gene counting. Haplotype diversity was calculated using Nei's formula. Alleles identified in Guzerat bulls were INRA189^{82bp}, INRA189^{90bp}, UMN0307^{151bp}, BM861^{158bp}, BYM-1^{258bp}, BYM-1^{260bp}. The genetic marker INRA189 presented segregation disturbances and was excluded from the analysis. BYM-1 presented two alleles while the two other markers were monomorphic. With the markers BYM-1, BM861 e UMN0307, it was possible to identify two haplotypes (H1: UMN0307^{151pb}, BM861^{158pb}, BYM-1^{258pb} e H2: UMN0307^{151pb}, BM861^{158pb}, BYM-1^{260pb}). Haplotype 1 was present in 83% of the animals. The low haplotype diversity observed (0,28 ± 0,07) is in good agreement with other studies in literature, that ascertained a small number of haplotypes in indicus breeds. Besides, that genetic diversity studies based on genealogical register of the Guzerat breed in Brazil have also pointed out the low genetic diversity, as well as the low effective population size. However, these results should be caustiously interpreted since the system must be improved by the association of aditional genetic markers.

1 INTRODUÇÃO

1.1 História dos zebuínos no Brasil

A origem de todos os bovinos domésticos pode ser rastreada até dois centros principais, a Ásia (*Bos indicus*) e a região da Europa (*Bos taurus*). Análises moleculares demonstraram uma enorme divergência genética entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, e que as duas espécies divergiram há mais de 250.000 anos a partir de um ancestral comum (BRADLEY *et al*., 1996). Os primeiros passos para a domesticação ocorreram no sudoeste da Ásia e o gado domesticado entrou na Europa (taurinos) e África (zebuínos) juntamente com a migração humana (BRADLEY *et al*., 1996; CARAMELLI, 2006).

Os zebuínos distinguem-se dos taurinos, principalmente pela presença da corcova, ou giba, e pela melhor adaptação às condições áridas (HANSEN, 2004; JORGE *et al*., 2006). Além disso, a partir da análise do cariótipo das duas espécies é possível observar que os taurinos possuem o cromossoma Y submetacêntrico ou metacêntrico, enquanto o cromossoma Y acrocêntrico é típico dos zebuínos (STRANZINGER *et al*., 2007).

As características típicas dos zebuínos são pele com pigmentação abundante, pelos curtos e lisos, maior tolerância ao calor, maior resistência a ecto- e endoparasitas, e maior capacidade de aproveitamento de forrageiras de baixo valor nutritivo (JORGE *et al*., 2006).

Os primeiros bovinos a pisar o solo brasileiro eram provenientes de Portugal e Espanha (*Bos taurus*) e foram introduzidos no país durante os primeiros séculos da colonização. Esses animais foram se estabelecendo em todo o país (JOSAHKIAN, 2003; EGITO, 2007).No entanto, os bovinos europeus aqui introduzidos perdiam grande parte do seu potencial produtivo ou sucumbiam devido às condições adversas do ambiente tropical e à presença de ecto- e endoparasitas. Os animais que demonstravam capacidade de aclimatação e sobreviviam à importação se mesclaram numa infinidade de tipos e/ou raças, dos quais, até hoje se encontram espécimes ou rebanhos (JOSAHKIAN, 2003).

O primeiro núcleo de animais zebuínos puros no Brasil foi estabelecido por D. Pedro I, em 1826, na Fazenda Real Santa Cruz, próxima ao Rio de Janeiro. Posteriormente, verificaram-se algumas importações de touros, casais ou pequenos lotes, de 1850 a 1908. As grandes importações de zebuínos coincidem, no entanto, com a Primeira Guerra Mundial, consequência direta da valorização da carne, para exportação. Entre o período de 1914 e 1918, 1.847 reprodutores de

raças zebuínas foram trazidos para o Brasil. Em 1921, após o surto de peste bovina, o governo brasileiro proibiu novas importações, fazendo com que os criadores passassem a se dedicar à seleção e ao melhoramento de seus plantéis no país (SANTIAGO, 1975).

Em 1930, criadores mineiros receberam uma licença especial do Ministério da Agricultura para trazer da Índia 192 reprodutores das raças Gir, Nelore, Guzerá e Sindi, numa época em que o rebanho zebuíno puro estava visivelmente reduzido, constituído de 80 a 90% de animais denominados Indubrasil, resultantes do cruzamento de diversas raças indianas, dentre elas Gir e Guzerá. A chegada de animais de raça definida trouxe maior interesse pela criação de gado puro, verificando-se então uma redução do número de adeptos da nova raça, que estava se formando no Triângulo Mineiro, a Indubrasil. Estima-se que até o ano de 1963, cerca de 6.262 bovinos, provenientes em maior proporção da Índia, foram trazidos para o país (SANTIAGO, 1975). Segundo a Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ), predominam, atualmente, no Brasil dez raças zebuínas: Brahman, Cangaian, Gir, Gir mocha, Guzerá, Indubrasil, Nelore, Nelore mocha, Sindi e Tabapuã (BEZERRA, 2007).

Contrapondo-se aos 6.262 zebuínos, cerca de 1 milhão de exemplares das raças européias entraram no território brasileiro. No entanto, atualmente, se estima que do rebanho nacional, de aproximadamente 210 milhões de cabeças (IBGE, www.ibge.org.br), 80% tenha genética zebuína, incluindo animais puros e cruzados. Isto evidencia a capacidade adaptativa dos zebuínos às nossas condições ambientais (JOSAHKIAN, 2003).

A raça Guzerá é originária do Estado de Gujarat, no centro da Costa Oriental da Índia, região de terras baixas e secas, em geral de solos arenosos, sem árvores. As chuvas (precipitação média anual entre 500 - 700 mm^3) se concentram entre julho e outubro e a temperatura varia de 5ºC a 50ºC. As condições adversas de sua região de origem favoreceram a sua rusticidade e adaptabilidade às regiões àridas. A raça é constituída por animais de grande porte, que tem sido explorados para produção de carne e leite, sendo tradicionalmente considerada de dupla aptidão. Destaca-se também pelo porte imponente, cabeça alta e chifres grandes, em forma de lira. A pelagem varia do cinza claro ao escuro, podendo ser branca nas fêmeas (fig. 1).

Os primeiros animais pertencentes à raça Guzerá foram trazidos da Índia em 1870 e eram utilizados para a produção de leite e carne, e também para arrastar carroções e vagões para transporte de café (CAMPOS, 2006). Estes animais adaptam-se muito bem no Nordeste brasileiro, povoando desde áreas férteis litorâneas, passando pelo agreste, até o sertão semi-árido. A raça

Guzerá tem se destacado entre as raças zebuínas devido ao seu bom desempenho para produção de leite e por apresentar crescimento rápido (ABCZ, referência eletrônica 1; PENNA *et al*., 2006).

Os animais da raça Guzerá apresentam precocidade, adaptabilidade, bom desempenho ponderal e boa qualidade de carne a custos baixos. Além disso, as fêmeas Guzerá têm se tornado ideais para produção de leite no sistema orgânico de produção, pois são adaptadas ao clima do Brasil (CAMPOS, 2006). Suas qualidades para a bovinocultura tropical fizeram com que a FAO a incluísse na lista de recursos genéticos mais importantes de serem preservados no mundo (HODGES *et al*., 1992; FAO 2007).

O Brasil é um dos maiores centros criatórios de Guzerá do mundo e um grande fornecedor de material genético da raça para outros países. Além disto, um núcleo MOET da raça Guzerá foi implantado no Brasil, concomitantemente, um teste de progênie, para o melhoramento genético da raça. O programa de melhoramento genético com foco na dupla aptidão tem crescido ao longo dos últimos anos (TEODORO *et al*, 2003; PEIXOTO *et al*., 2010).

O êxito dos programas de melhoramento para características leiteiras, junto com as de corte e reprodução e a versatilidade e rusticidade da raça, vêm garantindo-lhe mercado no país e no exterior. Além de importante recurso genético como raça pura, o Guzerá tem se tornado uma importante opção nos cruzamentos para produção de mestiços leiteiros (PENNA *et al*., 2008).



Figura 1 - Touro da raça Guzerá. Édipo da Alagoinha.

1.2 Programas de melhoramento genético

Os bovinos domésticos são os principais componentes da economia pastoril em todo mundo, contribuindo para o fornecimento de leite, a principal fonte de proteína da dieta humana, e também com outros importantes produtos como carne, couro e estrume (MACHUGH *et al*., 1997).

A grande variabilidade genética encontrada nas raças zebuínas constitui um fator importante para possíveis progressos através de programas de melhoramento animal. A seleção das diferentes raças é feita com base na escolha de indivíduos, que possuam um valor genético superior para características como produtividade para pais da geração seguinte. Esses animais são, então, usados como reprodutores, alterando-se a constituição genética do rebanho e obtendo-se assim um incremento na produtividade (ANDREAZZA, 2006).

A produção de animais pelo cruzamento entre raças com diferentes aptidões tem se tornado cada vez mais comum no Brasil. O objetivo desta abordagem é combinar as melhores características, otimizando-se assim os efeitos da heterose (cruzamento de indivíduos não-relacionados através do qual os filhos apresentam melhor desempenho do que a média dos pais) e os traços complementares das raças em benefício da economia, ou seja, os efeitos aditivos (MARSON *et al*., 2005).

De acordo com esta linha de raciocínio e devido ao potencial leiteiro reconhecido na raça Guzerá, em 1992, a Associação dos Criadores de Guzerá do Brasil (ACGB) passou a incentivar a execução do controle leiteiro oficial na raça. Este passo foi fundamental para a implantação do Programa Nacional de Melhoramento de Guzerá para Leite, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pelo Centro Brasileiro de Melhoramento do Guzerá. Tal programa é composto por duas ferramentas de melhoramento genético: o teste de progênie (TP) e o núcleo MOET (do inglês: *multiple ovulation and embryo transfer*) de seleção (PEIXOTO *et al*., 2009).

O teste de progênie é um método de avaliação do touro que se baseia no desempenho produtivo de sua progênie(filhas). Em sua maioria, estas filhas vêm de acasalamentos aleatórios, nos quais as vacas são inseminadas com sêmen codificado, em rebanhos puros e mestiços. Também são utilizadas, nesta avaliação, as filhas resultantes dos acasalamentos dirigidos, nos rebanhos puros em controle leiteiro oficial, via Arquivo Zootécnico Nacional (AZN), desde que atendidas as exigências de número, distribuição entre fazendas e conexão genética entre grupos

contemporâneos, além das informações de seus parentes ancestrais e colaterais. Este teste é lento, em função do longo intervalo de gerações da raça. Para que um touro seja avaliado e disponibilizado ao mercado é necessário que tenha gerado várias filhas e que estas tenham encerrado sua primeira lactação, o que geralmente leva seis anos. Porém, é o método mais preciso para se avaliar o real potencial genético de um touro para a produção de leite (PEIXOTO *et al*., 2009).

O núcleo MOET, utiliza a técnica de múltipla ovulação e transferência de embriões para produzir famílias de meio-irmãos e irmãos completos. Para avaliar os touros, leva-se em consideração o desempenho de suas irmãs completas, meio-irmãs paternas e maternas, e demais parentes (como no teste de progênie), estimando precocemente o valor genético do animal. Este método confere intensidade de seleção por trabalhar apenas com os melhores animais da raça e grande rapidez por avaliar os touros ainda jovens. Além disso, o tempo gasto para essa avaliação é metade do tempo requerido para a avaliação através de teste de progênie. É menos acurado que um teste de progênie com um grande número de filhas, porém permite maiores ganhos genéticos em função da maior rapidez e maior intensidade de seleção (PENNA *et al*., 1998; PEIXOTO *et al*., 2009).

Os animais produzidos no núcleo MOET podem ser, posteriormente, conduzidos ao teste de progênie e terem suas filhas aferidas. Tal avaliação incorpora acurácia ao teste e demonstra a vantagem de se integrar os dois programas, pois permite unir rapidez e acurácia (PENNA *et al*., 1998).

O primeiro passo para um processo de seleção é estimar o valor genético dos animais. Isto é feito, utilizando-se análises estatísticas que permitem estimar o valor genético a partir de seu próprio fenótipo (no caso das fêmeas), do fenótipo de seus parentes ancestrais, colaterais e de progênies (no caso dos machos). A técnica de avaliação é baseada no modelo animal BLUP (*Best linear unbiased prediction*), uma metodologia que produz estimativas dos valores genéticos das diferenças esperadas na progênie (DEP). A DEP é, portanto, uma previsão da capacidade de um animal transmitir determinada característica para sua prole. É geralmente utilizada para comparar o possível desempenho das filhas de um touro com as de outros que também participaram da avaliação, possibilitando ao criador escolher o animal com maior capacidade de transmissão da característica de interesse, como reprodutor em seu rebanho. Para que essa comparação seja verdadeira, é necessário que os animais em teste sejam acasalados com um grupo de vacas comparáveis em um mesmo rebanho e que os produtos resultantes recebam o mesmo tratamento

após o nascimento. A DEP prediz diferenças e não valores absolutos. Desta forma, da comparação entre um touro que possui DEP de + 25kg para produção leiteira, com um touro com DEP de -10kg, pode-se esperar que as filhas do primeiro irão produzir em média 35kg a mais que as filhas do segundo, na população em que forem usados. Uma das características leiteiras avaliadas no programa, e que será usada no presente trabalho, é a produção de leite corrigida para um período de lactação padrão de 305 dias (PANETTO *et al.*, 2010; PEIXOTO *et al*., 2010).

Os programas de avaliação genética visam promover o melhoramento genético, identificando indivíduos geneticamente superiores para as características de interesse, comparando e divulgando os melhores reprodutores, o que leva ao seu uso intensivo em escala nacional, por meio de técnicas de reprodução assistida (MELO, 2006). Tal fato, no entanto, pode comprometer o sucesso do programa por acarretar aumento do coeficiente de endogamia e perda da diversidade genética da raça (PEIXOTO *et al*., 2010).

Os trabalhos de melhoramento da raça, geralmente são voltados para uma determinada característica, o que se denomina seleção unidirecional. Esta pode ter como consequência a seleção, por efeitos de carona, de características indesejáveis. No caso da seleção para leite, a fertilidade dos rebanhos tem declinado na medida que ocorre o aumento da produção leiteira (GARCÍA-ISPIERTO *et al*., 2007; STRANZINGER *et al*., 2007; BARBAT *et al*., 2010).

1.3 A diversidade genética do Guzerá

O Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite teve início em 1994. Nestes 16 anos, foram provados para leite mais de 300 touros provenientes do teste de progênie, do núcleo MOET e do Programa de Melhoramento Genético das Raças Zebuínas da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (PMGZ/ABCZ). O primeiro sumário de touros para características leiteiras foi publicado no ano de 2000. Até agora, somam-se 11 sumários publicados anualmente. No último sumário os dados foram oriundos de 68 rebanhos (39 puros e 29 mestiços), participantes do PMGZ/ABCZ, do Teste de Progênie e do Núcleo MOET (PEIXOTO *et al*., 2010).

Até 1993, apenas 12 rebanhos possuíam algum dado leiteiro e existiam apenas 277 primíparas aferidas oficialmente na raça. O número de primíparas aferidas vem aumentando

substancialmente desde a implantação do Programa. Desde 2005, o número aferido anualmente já era muito superior a todo o conjunto de dados existentes até o ano de 1993. Esta tendência traduz o forte crescimento do programa e demonstra a ampliação da população rastreada para a produção de leite, que podem conduzir a aumentos na acurácia e eficiência das avaliações (PENNA *et al*., 2008).

Nos programas MOET e TP do Guzerá, o delineamento cuida que estejam representadas diversas linhagens, visando diminuir riscos de aumento da consanguinidade pelo afunilamento genético decorrente do uso intenso de alguns poucos reprodutores famosos e seus descendentes (PEIXOTO *et al*., 2010). Porém, alguns estudos recentes têm demonstrado o aumento do coeficiente de endogamia com o passar das gerações em rebanhos melhorados, que pode ser devido à intensa utilização de reprodutores com alto valor genético (POGGIAN, 2008; FARIA *et al*., 2009).

Em um estudo publicado em 2002, Faria e colaboradores divulgaram que a raça Guzerá possuía um pequeno tamanho efetivo da população (Ne 104), que, embora baixo, é maior do que o encontrado para outras raças zebuinas no Brasil, como Gir (45) e Nelore (68). O mesmo grupo observou que a variabilidade genética da raça decresceu ao longo do tempo no período de 1979 a 1998, indicando a necessidade de monitoração da raça e do estabelecimento de estratégias para previnir complicações que possam ocorrer no futuro (FARIA *et al*., 2004). O coeficiente médio de endogamia da raça Guzerá tem sido estimado entre 4 e 5% (VIEIRA *et al*., 2005; PEIXOTO *et al*., 2006; TEODORO *et al*., 2007; PEIXOTO *et al*., 2010).

Machado e colaboradores (2003) utilizaram nove marcadores microssatélites em quatro raças de zebuínos com o intuito de averiguar a diversidade genética dentro e entre as raças. A heterozigosidade média para os nove *loci* foi de 35% sendo que o esperado sobre a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg seria de 53%. Esta baixa heterozigosidade sugere que, dentro de cada raça, os animais avaliados apresentam alta endogamia que pode ser um resultado de intenso processo de seleção para carne e leite.

Poggian em 2008, estudou a variabilidade genética e endogamia nos rebanhos de Guzerá selecionados para produção leiteira. Neste estudo, foi possível observar que o tamanho efetivo da população, em média, é 77, com número efetivo de fundadores e de ancestrais igual a 318 e 101, respectivamente; recomendando-se a prática de acasalamentos dirigidos. O intervalo de gerações (7,48 anos) encontra-se elevado e foi possível detectar ainda que, o efeito gargalo encontra-se

acentuado, podendo corresponder a uma diminuição no número de reprodutores devido à seleção para produção de leite, evidenciando o risco de perda da diversidade genética da população.

Este trabalho visa averiguar quantas linhagens masculinas estão sendo avaliadas nos programas de melhoramento genético com o intuito de contribuir para um melhor planejamento destes programas visando a manutenção da diversidade genética nos plantéis.

1.4 O cromossoma Y

Os bovinos possuem 60 cromossomas, 58 autossômicos e o par sexual XX ou XY. Os machos são heterogaméticos e possuem um cromossoma X e um Y. O cromossoma Y é um dos menores do cariótipo bovino, sendo composto por uma pequena região (5%) pseudo-autossômica (homóloga ao cromossoma X) e a região Y-específica, que corresponde a 95% do cromossoma (LIU *et al*., 2002). Com exceção da região pseudo-autossômica, o cromossoma Y é transmitido como uma unidade não-recombinante e macho-específica. Assim, a informação passa de pai para filho sem que haja variação ou alterações, exceto aquelas criadas por mutações na linhagem germinativa, durante a formação dos gametas (EDWARDS *et al*., 2000; JORGE *et al*., 2006).

O genoma de bovino foi publicado em 2009, baseado em sequências geradas a partir de uma vaca taurina da raça Hereford e, no mesmo ano, de uma segunda vaca taurina, da raça alemã Fleckvieh (*Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium*, 2009; ECK *et al*., 2009). Só recentemente começam a ser depositadas sequências do cromossoma Y bovino. As regiões repetitivas presentes nesse cromossoma dificultam o mapeamento genético (SKALETSKY *et al*., 2003). Apesar disso, Liu e colaboradores (2002) produziram um mapa do cromossoma Y de bovinos e identificaram 13 genes localizados na região pseudo-autossômica e 46 marcadores genéticos na região não recombinante. Di Meo e colaboradores (2005) produziram o mapa citogenético do cromossoma Y de bovinos e compararam evolutivamente com demais representantes da família Bovidae.

Em animais domésticos, a análise de polimorfismos Y-específicos é escassa e estudos recentes têm demonstrado que a variabilidade genética é reduzida. Em bovinos, a diversidade do cromossoma Y é inferior a dos autossomas e o número efetivo de machos tende a ser ainda menor

devido aos esquemas de acasalamento e aos programas de melhoramento genético (JORGE *et al*., 2006; PENNA, 2008; PEIXOTO et al., 2010).

1.5 Marcadores genéticos no cromossoma Y

Marcadores moleculares do DNA têm sido amplamente utilizados em análises de variabilidade genética, pois contribuem com informações sobre todas as regiões do genoma, independentemente do nível de expressão gênica (PANDEY *et al*., 2006). Além disso, eles fornecem a mais alta precisão na identificação individual e em estudos de vínculo genético, transformando-se em uma ferramenta complementar do melhoramento para a seleção (KAPPES *et al*., 1997).

Marcadores moleculares no cromossoma Y de bovinos podem tanto ser utilizados para o melhoramento genético, como em pesquisas de diversidade genética, porque, com exceção das regiões pseudo-autossômicas, seus haplótipos específicos funcionam como marcadores da linhagem masculina. Estas características asseguram que combinações originadas de eventos de mutação ao longo de linhagens de machos são preservadas como ligadas em um bloco haplotípico, podendo ser usadas para análise de diversidade genética dentro e entre populações (EDWARDS *et al*., 2000).

Os microssatélites têm um alto grau de polimorfismo e têm sido efetivamente explorados para entender a domesticação e o padrão de migração da espécie bovina (BRADLEY *et al*., 1994; LOFTUS *et al*., 1994; EDWARDS *et al*., 2007; *The Bovine HapMap Consortium*, 2009; PÉREZ-PARDAL *et al*., 2010) e para avaliar a diversidade genética e as relações evolutivas entre bovinos (MacHugh *et al*., 1997; ALMEIDA *et al*., 2000; HANOTTE *et al*., 2000; CAÑON *et al*., 2001; WARD *et al*., 2001;KIM *et al*., 2002; Liu *et al*., 2002; MAUDET *et al*., 2002; JORDANA *et al*., 2003; METTA *et al*., 2004; MUKESH *et al*., 2004; MAO *et al*., 2007; Li *et al*., 2007; EDWARDS *et al*., 2007; GINJA *et al*., 2009; KANTANEN *et al*., 2009; XIN *et al*., 2009; PÉREZ-PARDAL *et al*., 2010).

A herança materna tem sido amplamente utilizada para determinar a origem e diversidade do gado taurino, mas pesquisas que englobam a diversidade herdada pelo pai através do cromossoma Y ainda são poucas (EDWARDS *et al*., 2000; HANOTTE *et al*., 2000;

GIOVAMBATTISTA et al., 2000; WARD *et al*., 2001; Liu *et al*., 2002; VERKAAR *et al*., 2003; EDWARDS et al., 2007; GINJA *et al*., 2009; KANTANEN *et al*., 2009; XIN *et al*., 2009; PÉREZ-PARDAL *et al*., 2010; EDWARDS *et al*., 2011). Durante o sequenciamento do genoma bovino, foi gerado sequências de fêmeas e só recentemente começam a ser publicadas sequências do cromosssoma Y. Ainda assim, os marcadores específicos para esse cromossoma, já identificados, têm sido úteis para identificar o fluxo de genes entre populações mediado por machos (HANOTTE *et al*., 2000; GIOVAMBATTISTA *et al*., 2000; VERKAAR *et al*., 2003; UNDERHILL & KIVISILD 2007; GINJA *et al*., 2010) e em estudos de estrutura genética de população (LIRÓN *et al*., 2006; LI *et al*., 2007; MAO *et al*., 2007; GINJA *et al*., 2009a). Além disso, a utilização de marcadores Y-específicos têm aumentado a confiabilidade na caracterização de patrilinhagens e permitindo distinguir subdivisões em *Bos taurus* (PÉREZ-PARDAL *et al*., 2009).

Estudos buscando caracterizar os haplótipos de cromossoma Y para as raças de bovinos domésticos têm sido realizados com maior intensidade nos últimos anos, mas ainda são escassos os marcadores descritos como polimórficos para a região não-recombinante do cromossoma Y.

O primeiro marcador microssatélite isolado para bovinos foi o BM861 (BISHOP *et al*., 1994), durante a construção de um mapa genético de ligação para os cromossomas X e Y. Neste trabalho, foram desenvolvidos 313 marcadores, dentre os quais, cinco (BM861, BM2113, BM4117, BM1223 e BM6444) são Y-específicos. No mesmo ano, Vaiman e colaboradores isolaram novos marcadores para o genoma de bovinos, incluindo os microssatélites Y-específicos INRA124 e INRA126. Três anos depois, Kappes e colaboradores (1997), utilizaram 1.236 marcadores (627 dos quais isolados por estes autores) de DNA, incluindo os marcadores BM861 e INRA189, e 14 antígenos eritrocitários, e forneceram uma melhor resolução do mapa genético de bovinos. Os marcadores genéticos BYM-1 e UMN0307 foram isolados mais recentemente (Ward *et al*., 2001 e Liu *et al*., 2002, respectivamente).

Edwards e colaboradores (2000) utilizaram os marcadores BM861, INRA189, entre outros, com o intuito de detectar polimorfismos entre e dentro de várias espécies/raças pertencentes à família Bovidae, incluindo 12 animais da raça Nelore (zebuína). Os microssatélites utilizados apresentaram variação entre as raças, sendo capazes de distinguir taurinos de zebuínos, mas não foi encontrada variação entre os touros da raça Nelore analisados.

Ward e colaboradores (2001) utilizaram o microssatélite BYM-1 para analisar a possível introgressão de touros taurinos em uma amostra de *Bison bison.* Como resultado, eles observaram

que todos os machos *Bison bison* eram portadores do alelo BYM-1^{242pb}, enquanto dois alelos (BYM-1^{255pb} e BYM-1^{257pb}) foram observados nas raças taurinas analisadas, levando a conclusão que não houve introgressão de macho.

Li e colaboradores (2007), com o objetivo de analisar a estrutura genética da população de bovinos africanos, utilizaram os microssatélites BM861, INRA189 e BYM-1, entre outros marcadores. Nos indivíduos representantes da raça zebuina estudada (Begait), somente o marcador BYM-1, dentre os referidos acima, apresentou variação com os alelos BYM-1^{256pb} e BYM-1$^{260\ pb}$, enquanto os marcadores BM861 e INRA189 apresentaram um único alelo cada (BM861^{156pb} e INRA189^{88pb}, respectivamente).

Kantanen e colaboradores (2009) utilizaram cinco marcadores microssatélites (BM861, BYM-1, INRA124, INRA189 e DYZ-1) com o objetivo de analisar a diversidade genética do cromossoma Y em bovinos. Para as raças zebuínas analisadas, foram encontradas dois alelos para os microssatélites BM861 (BM861^{156pb} e BM861^{158pb}) e INRA189 (INRA189^{88pb} e INRA189^{90}pb), e para o marcador BYM-1 foram encontrados três alelos (BYM-1^{254pb}, BYM-1^{256pb} e BYM-1^{258pb}). Para as raças taurinas, o marcador BM861 foi bialélico (BM861^{158pb} e BM861^{160pb}), o INRA189 apresentou sete alelos (INRA189^{82pb}, INRA189^{90pb}, INRA189^{98pb}, INRA189^{100pb}, INRA189^{102pb}, INRA189^{104pb} e INRA189^{106pb}), e o BYM-1, quatro (BYM-1^{252pb}, BYM-1^{254pb}, BYM-1^{256pb} e BYM-1^{258pb}).

Ginja e colaboradores (2009) definiram haplótipos para o cromossoma Y de bovinos baseando-se em sete marcadores microssatélites (DDX3_Y1, BM861, INRA124, INRA129, UMN0103, UMN0307 e UMN0504), cinco SNPs e uma INDEL. O grupo encontrou 2 alelos para o marcador BM861 (BM861^{156pb} e BM861^{158pb}), sendo que o alelo BM861^{156pb} foi encontrado somente em zebuínos e o BM861^{158pb} em taurinos; o microssatélite INRA189 apresentou 8 alelos (INRA189^{86pb}, INRA189^{88pb}, INRA189^{90pb}, INRA189^{98pb}, INRA189^{100pb}, INRA189^{102pb}, INRA189^{104pb}, INRA189^{106pb}), mas apenas os alelos INRA189^{88pb} e INRA189^{90pb} foram encontrados em *Bos indicus*; e dos 4 alelos encontrados para o microssatélite UMN0307 (UMN0307^{135pb}, UMN0307^{149pb}, UMN0307^{151pb} e UMN0307^{155pb}), somente UMN0307^{149pb} e UMN0307^{151pb} foram observados nas raças zebuínas. Vale ressaltar que todos os touros da raça Brahman desta amostra pertenciam a um único haplótipo (H9Y3, com os alelos BM861^{156pb}, INRA189^{88pb} e UMN0307^{149pb}), assim como todos os animais da raça Gir (H18Y3, com os alelos BM861^{156pb}, INRA189^{88pb} e UMN0307^{149pb}).

Pérez-Pardal e colaboradores (2009) investigaram a estrutura e diversidade haplotípica em raças taurinas da Europa e África utilizando uma combinação de 2 SNPs e 6 microssatélites Y-específicos (INRA189, BYM-1, BM861, UMN0307, UMN0103_a, UMN0103_b). Foram amostrados 405 touros de 45 populações e 26 haplótipos foram encontrados. Os alelos identificados para os quatro marcadores foram: INRA189 (INRA189^{148pb}, INRA189^{152pb}, INRA189^{154pb}, INRA189^{156pb}, INRA189^{158pb}, INRA189^{160pb}, INRA189^{162pb}, INRA189^{164pb}, INRA189^{166pb,} que correspondem aos seguintes alelos encontrados pelos demais autores: INRA189^{90pb}, INRA189^{94pb}, INRA189^{96pb}, INRA189^{98pb}, INRA189^{100pb}, INRA189^{102pb}, INRA189^{104pb}, INRA189^{106pb}, INRA189^{108pb}), BYM-1 (BYM-1^{250pb}, BYM-1^{252pb}, BYM-1^{254pb}, BYM-1^{256pb}), BM861 (BM861^{156pb}) e UMN0307 (UMN0307^{135pb}, UMN0307^{147pb}, UMN0307^{149pb}, UMN0307^{151pb}, UMN0307^{155pb}, UMN0307^{157pb}).

Edwards e colaboradores (2011) utilizaram os marcadores INRA189 e BM861 e SNPs para analisar a estrutura haplotípica do cromossoma Y em 2.087 bovinos. O *locus* INRA189 foi o mais informativo, com 10 alelos (INRA189^{80pb}, INRA189^{88pb}, INRA189^{90pb}, INRA189^{94pb}, INRA189^{96pb}, INRA189^{98pb}, INRA189^{100pb}, INRA189^{102pb}, INRA189^{104pb}, INRA189^{106pb}) e o BM861, apresentou três (BM861^{156pb}, BM861^{158pb}, BM861^{160pb}). Todos os 16 animais zebuínos amostrados (raças Nelore e Ongole), apresentaram um único haplótipo, constituído do alelo INRA189^{88pb} e BM861^{156pb}. No total de raças estudadas, foram identificados 19 haplótipos e a diversidade haplotípica média por raça foi de 0,42 ± 0,3, com haplótipos fixados em 65 das 111 (59%) raças amostradas.

Outros marcadores, além dos usados no presente estudo, também vêm sendo utilizados. Hanotte e colaboradores (2000) foram os primeiros a utilizar o marcador INRA124 para analisar a distribuição geográfica e frequência deste entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Foram genotipados 984 touros, representando 69 raças. O alelo taurino (INRA124^{132pb}) foi observado em nove raças classificadas como zebuínas ou produtos de cruzamentos zebuínos *vs.* sanga e em 18 raças classificadas como sanga, enquanto o alelo zebuíno (INRA124^{130pb}) foi encontrado em oito raças classificadas como taurinas e em 10 raças classificadas como sanga. Em todas as raças estudadas, somente duas eram puras para o cromossoma Y, as demais populações taurinas possuiam alelo zebuíno. Estes resultados são semelhantes aos descritos previamente (BRADLEY *et al*., 1994).

Giovambattista e colaboradores (2000), com intuito de estudar a distribuição geográfica e frequência haplotípica do cromossoma Y de taurinos e zebuínos da Argentina e da Bolívia,

utilizaram o microssatélite INRA124. Neste estudo, 85.7% dos animais portavam o alelo taurino INRA124^{132pb} e 14.3% o alelo zebuíno INRA124^{130pb}.

Xin e colaboradores (2009) genotiparam seis *loci* de microssatélite Y-específicos (UMN0920, INRA124, UMN0929, UMN0108, UMN2404 e UMN0103) em uma amostra constituída de 423 touros de raças zebuinas chinesas e todos os marcadores apresentaram mais de um alelo. Os marcadores INRA124 (alelos INRA124^{130pb} e INRA124^{132pb}), UMN0103 (UMN0103^{125pb}, UMN0103^{136pb}, UMN0103^{140pb}, UMN0103^{155pb}) e UMN2404 (UMN2404^{85pb}, UMN2404^{91pb}, UMN2404^{104pb}, UMN2404^{110pb}, UMN2404^{120pb}) foram capazes de distinguir os *Bos taurus* dos *Bos indicus*, onde os zebuínos apresentam o alelo UMN0103^{125pb} ou UMN0103^{136pb} para o marcador UMN0103; o alelo UMN2404^{85pb} ou UMN2404^{110pb} ou UMN2404^{120pb}, para o marcador UMN2404; e o alelo INRA124^{132pb} para o marcador INRA124.

Edwards e colaboradores (2007) analisaram amostras de oito raças taurinas do Oriente Médio, através do microssatélite Y-específico INRA124, com o intuito de estimar a proporção de cromossoma Y zebuíno presente em cada população. O microssatélite foi genotipado em 104 machos e a análise foi baseada na presença do alelo INRA124^{130pb}, caracterizado como alelo zebuíno (BRADLEY *et al*., 1944., HANOTTE *et al*., 1997). O alelo foi observado na maioria dos touros, resultado considerado sugestivo introgressão mediada por machos zebuínos. Em estudos anteriores, o marcador INRA124 apresentou polimorfismo entre as raças taurinas e zebuínas (EDWARDS *et al*., 2007; KANTANEN *et al*., 2009), e no estudo de Pérez-Pardal e colaboradores (2009), foram observados polimorfismos dentro de ambos os taxas, onde três alelos diferentes foram observados para taurinos (INRA124^{130pb}, INRA124^{132pb} e INRA124^{134pb}) e três em zebuínos (INRA124^{126pb}, INRA124^{128pb} e INRA124^{132pb}).

Até o atual momento, encontram-se caracterizados cerca de uma dezena de microssatélites polimórficos para o cromossoma Y de bovinos (KAPPES *et al*., 1997; EDWARDS *et al*., 2000; LIU *et al*., 2003; XIN *et al*., 2009; GINJA *et al*., 2009), porém nenhum deles foi usado para caracterização dos rebanhos brasileiros.

Neste projeto utilizamos quatro microssatélites Y-específicos que têm sido utilizados pelo pesquisador Luís J. Royo e caracterizados com alto conteúdo de informação polimórfica. São eles: INRA189, UMN0307, BYM-1 e BM861 (Luís J. Royo, comunicação pessoal).

1.6 Justificativa e relevância

O setor pecuário é um dos segmentos de maior crescimento econômico, especialmente nos países em desenvolvimento, sendo que a pecuária contribui com 40% do valor global da produção agrícola (FAO, 2009).

O Brasil é detentor do maior rebanho mundial de bovinos e é considerado um dos mais importantes centros de criação e seleção de raças zebuínas. É classificado como o sexto maior produtor mundial de leite, com produtividade média do rebanho de 1.237 litros/vaca/ano, crescendo a uma taxa anual de 4%, superior a todos os países que ocupam os primeiros lugares. Além disso, o Brasil responde por 66% do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul. Vale ressaltar, que aproximadamente 80% do leite produzido no país é proveniente de vacas mestiças leiteiras com algum grau de sangue zebuíno (ALVIM, *et al*., 2005; ANDREAZZA, 2006; IBGE, 2007).

O leite está entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como café beneficiado e arroz. Além disso, o Agronegócio do Leite e seus derivados desempenham papel importante no suprimento de alimentos, na geração de empregos e renda para a população. Para cada Real de aumento na produção no sistema agroindustrial do leite, há um crescimento de, aproximadamente, cinco Reais de aumento do PIB, o que coloca o agronegócio do leite à frente de setores importantes, como o da siderurgia e da indústria têxtil.

Além de sua importância nutritiva, o leite desempenha um importante papel social, principalmente na geração de empregos. Em 2005 o País já tinha acima de um milhão e cem mil propriedades que exploram leite, ocupando diretamente 3,6 milhões de pessoas. A elevação na demanda final por produtos lácteos em um milhão de Reais gera 195 empregos permanentes. Este impacto supera o dos setores automobilísticos, o de construção civil, o siderúrgico e o têxtil (ALVIM *et al*., 2005).

O Estado de Minas Gerais é a principal unidade da federação no valor da produção pecuária primária (26,1% de participação). Destaca-se também na produção de leite, respondendo por 30,3% do valor total da produção de leite do país (IBGE, 2007).

Entretanto, a produção pecuária tem aumentado em todo o mundo baseada em um número limitado de raças e a diversidade genética dentro dessas raças está em declínio. A produção global de carne, leite e ovos é cada vez mais baseada em um número limitado de raças de alta produção (as raças mais lucrativas no sistema de produção) (FAO, 2007).

Estima-se que 50% do progresso da produção leiteira seja devido à genética e muito pouco se sabe sobre o grau de redução da diversidade causado pelo cruzamento indiscriminado dentro raças. Este é um problema considerado por muitos especialistas como a principal ameaça para a diversidade genética em animais de criação (FAO, 2007). Além disso, vários estudos têm divulgado que a fertilidade dos rebanhos tem declinado proporcionalmente aos rendimentos ascendentes da produção de leite (LÓPEZ-GATIUS *et al*., 2006; DOBSON *et al*., 2007; BARBAT *et al*., 2010) e o índice de endogamia nos rebanhos tem aumentado (FARIA *et al*., 2009; PEIXOTO *et al*., 2010).

Panetto e colaboradores (2010) analisaram a depressão endogâmica na raça Guzerá e observaram que o monitoramento do sistema de monta conseguiu diminuir o índice de endogamia.

O Guzerá é a única raça zebuína que atende aos dois nichos de mercado – corte especializado ou duplo-propósito. Pura ou em cruzamentos, é uma raça versátil, o que favorece o lucro. É também a única a possuir programas de melhoramento integrados para corte e leite de modo a oferecer material genético comprovado simultaneamente para ambas características (PENNA *et al*., 2006).

O desenvolvimento e a caracterização de um sistema haplotípico para o cromossoma Y tornará possível analisar o grau de diversidade genética dos touros participantes dos programas de melhoramento e assim monitorar as próximas gerações de acasalamento nos rebanhos. Este conhecimento poderá ser utilizado durante as estratégias de melhoramento genético para evitar a perda de diversidade genética.

Diferenças nas frequências alélicas e haplotípicas têm sido encontradas em bovinos (EDWARDS *et al*., 2000; LI *et al*., 2007), sugerindo sua aplicabilidade para estudos de diversidade genética do gado doméstico. Para os eventos evolucionários mais recentes, microssatélites Y-específicos podem ter potencial para identificar mais linhagens de cromossomas Y (BOSCH *et al*., 1999).

Não há na literatura trabalho que tenha utilizado marcadores microssatélites no cromossoma Y da raça Guzerá para estudo de diversidade genética e caracterização Y-haplotípica.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade genética dos touros da raça Guzerá, que participam dos programas de melhoramento genético, através de marcadores moleculares (microssatélites) do cromossoma Y.

1.7.2 Objetivos específicos

Desenvolver e validar um sistema haplotípico do cromossoma Y baseado em microssatélites;

Comparar o sistema haplotípico desenvolvido com os dados de genealogias da raça Guzerá;

Averiguar a existência de diferenças entre as DEPs de produção leiteira de animais com diferentes haplótipos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra

A amostra foi constituída de 54 touros provados da raça Guzerá oriundos do núcleo MOET e/ou teste de progênie (PEIXOTO *et al*., 2010). Foram coletados 8 mL de sangue de vaso periférico em frasco tipo vacutainer estéril com EDTA. As amostras de DNA foram provenientes de amostras depositadas no banco de DNA do Laboratório de Genética Humana e Médica do Departamento de Biologia Geral do ICB-UFMG e do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite.

2.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue periférico foi realizada por digestão com proteinase K seguida de precipitação salina, conforme descrito por Miller e colaboradores (1988).

2.3 Genotipagem dos loci microssatélites

Foram utilizados um conjunto de quatro microssatélites Y-específicos de *Bos taurus*, que são: INRA189, BYM-1, BM861 e UMN0307, cuja sequência de iniciadores (*primers*) foi-nos fornecida pelo pesquisador Luis J. Royo.

A sequência dos marcadores e a estimativa do tamanho dos amplicons foi feita com o software Short sequence BLAST, usando-se na busca a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR (*primers*) contra o banco de dados do NCBI, com parâmetros *default* (ref. eletrônica 2).

Visando obter maior economia, praticidade e especificidade da amplificação, acrescentamos a cada sequência de iniciadores *forward* uma cauda com a sequência do *primer* M13-universal, numa estratégia descrita na literatura (SHUELKE, 2000). Estes *primers* com cauda M13 foram marcados com fluorescência 6-FAM para possibilitar a análise através de sequenciador automático de DNA. As sequências dos *primers* dos microssatélites estão disponíveis na Tab. 1.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) tiveram um volume final de 25µL, com 10 mM TrisHCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,75 mM $MgCl_2$, 0,1 % Triton X-100, 0,2 mM de cada dNTP (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), 1 U *Taq* DNA polimerase (*Phoneutria Biotecnologia e Serviços, Belo Horizonte, MG, Brasil*), 0,63 pmol/µL do iniciador *forward* (exceto para o marcador UMN0307, para o qual utilizou-se 2,0 pmol/µL) e 6,26 pmol/µL do iniciador *reverse* para cada microssatélite (com excessão do marcador INRA189 para o qual se utilizou 3,0 pmol/µL) (*SINAPSE BIOTECNOLOGIA, São Paulo, SP, Brasil*), usando-se aproximadamente 200/400 ng de DNA genômico como molde. O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, compostos por 94 °C por 30 segundos, 56/58/60 °C por 130 segundos e 72 °C por 100 segundos, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos de PCR foram separados por eletroforese capilar através dos sequenciadores automáticos de DNA modelo ABI3130 (*Applied Biosystems, USA*) e MegaBACE™ (*GE Healthcare, USA*), utilizando-se como padrão interno de peso molecular o GenScan™ ROX 500™. No presente estudo foram utilizados três sequenciadores automáticos, dois deles eram MegaBACE™ (*GE*) e um deles, um ABI 3130 (*Applied Biosystems*). O tamanho dos alelos foi determinado utilizando-se o *software* Gene Mapper® ID versão 3.2 e visualizador Peak Filter (*Applied Biosystems, USA*), para os fragmentos obtidos através do ABI3130, e o software Fragment Profile versão 1.2, para os fragmentos obtidos através do MegaBACE™.

Tabela 1 Sequência de *primers* e temperatura para os marcadores microssatélites

Nome do Locus	**Sequência 5'-3'**	**Temperatura (°C)**
M13 (Fam)	Gggttccctaagggttgga	
INRA189-F	gggttccctaagggttggaTTTTGTTTCCCGTGCTGAG	60
INRA189-R	GAACCTCGTCTCCTTGTAGCC	
BYM-1-F	gggttccctaagggttggaCCTTGTTTGAGCTTGACCAGT	58
BYM-1-R	TTGCAGGCACAGAAACGGA	
BM861-F	gggttccctaagggttggaTTGAGCCACCTGGAAAGC	58
BM861-R	CAAGCGGTTGGTTCAGATG	
UMN0307-F	gggttccctaagggttggaGATACAGCTGAGTGACTAAC	
UMN0307-R	GTGCAGACATCTGAGCTGTG	56

2.4 Análises estatísticas

As frequências alélicas foram estimadas por contagem gênica. A diversidade gênica (DG) foi calculada de acordo com a fórmula de Nei (1987)

$$DG = (n/n-1)(1-\Sigma pi^2) \quad (1)$$

onde **n** se refere ao tamanho amostral e **pi** é a frequência alélica do marcador em análise.

Uma vez que o cromossoma Y não possui homólogo, e por este motivo é herdado em bloco, torna-se mais informativa a análise dos resultados sob a forma de um haplótipo ao invés dos diversos marcadores individualmente. Por isto, também foram calculadas as frequências e os índices de diversidade haplotípica. A frequência dos haplótipos foi calculada por contagem gênica e a diversidade haplotípica por sua vez, foi calculada utilizando a mesma fórmula, sendo que neste caso o **pi** representa as frequências haplotípicas. O desvio padrão para a estimativa da diversidade haplotípica foi calculado segundo a equação

$$\delta = \sqrt{(2/n)[\Sigma\, pi^3 - (\Sigma\, pi^2)^2]}$$ (Nei, 1987) (2)

onde **n** se refere ao tamanho amostral e **pi** representa as frequências haplotípicas.

Os resultados obtidos através dos marcadores Y-específicos foram comparados com os dados de genealogias das famílias e linhagens da raça. O acesso aos dados genealógicos foi feito através de contato pessoal com a Drª Vânia Maldini Penna e a Drª Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto.

Para averiguar se o haplótipo mais frequente identificava uma linhagem de alta produção leiteira, averiguou-se a possível associação entre os haplótipos do cromossoma Y e as DEPs de produção leiteira. Para isso, os touros foram agrupados por haplótipo e sendo estimada a DEP média por haplótipo, com base nas DEPs divulgadas pelo Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite (PEIXOTO *et al*., 2010). Estas DEPs médias por haplótipo foram comparadas com o teste *t-Student*, através do software Minitab versão 15 (ref. eletrônica 4).

3 RESULTADOS

3.1 Seleção de marcadores moleculares e sua caracterização bioinformacional

A seleção dos marcadores moleculares a serem usados no presente estudo foi feita por meio de revisão de literatura e com base em comunicação pessoal com o pesquisador Luís J. Royo. Como a taxa de mutação dos sistemas e, consequentemente, seu conteúdo informacional depende de características do motivo da repetição, que não estavam disponíveis nas publicações, inicialmente procedeu-se a uma busca em bases de dados, para identificar os microssatélites escolhidos. Estas buscas foram feitas na base de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, ref. eletrônica 1) usando-se os *primers* de cada sistema como motivo de busca. Esta estratégia permitiu a identificação da sequência dos quatro marcadores.

Os microssatélites UMN0307 e BYM-1 possuem repetições dinucleotídicas simples de $(AC)_n$, o INRA189 é formados por repetições dinucleotídicas simples de $(GT)_n$ e o BM861 é formado pelo motivo de repetição $[CA_{(10)} + GA + CA_{(5)}]_n$. Além disto, estas buscas permitiram a identificação do tamanho do produto de PCR para o alelo que foi sequenciado em cada sistema. O tamanho do amplicon previsto a partir da sequência do alelo de *Bos taurus*, depositada nas bases de dados, permitiu prever os seguintes tamanhos de fragmentos (excluindo-se da sequência do *primer* o fragmento da cauda de M13): para o INRA189 (GI:508117, acesso em 10/05/2009), 156 pb; para o BYM-1 (GI: 226192168, acesso em 10/05/2009), 243 pb; para o marcador BM861 (GI: 21521274.1, acesso em 10/05/2009), 158 pb; e para o UMN0307 (GI: 23954447, acesso em 10/05/2009), 151pb.

Na Tab. 2, é apresentada a conversão de tamanho de fragmento para nome de alelo, que foi feita com o objetivo de igualarmos a nomenclatura usada aqui com a da literatura. Os tamanhos dos fragmentos apresentados acima para cada marcador foram ajustados, retirando-se em cada caso os 19 pares de bases da cauda de M13. Além disto, foi observado, a partir do BLAST, que o tamanho do amplicom esperado no presente trabalho, para o marcador INRA189 continha 58 pares de bases a mais do que o obtido com os *primers* usados por outros (LI *et al*., 2007; GINJA *et*

al., 2009). Logo, subtraindo-se esse tamanho do amplicon obtido (148 - 58 = 90 e 140 - 58 = 82), foi possível obter tamanho de fragmentos equivalente aos encontrados na literatura.

Tabela 2 Tamanho do fragmento de cada marcador genotipado e seu alelo correspondente, de acordo com a literatura

Tamanho do fragmento	**Alelo correspondente**
159pb	$INRA189^{82pb}$
167pb	$INRA189^{90pb}$
277pb	$BYM\text{-}1^{258pb}$
279pb	$BYM\text{-}1^{260pb}$
177pb	$BM861^{158pb}$
170pb	$UMN0307^{151pb}$

Fonte: Ginja *et al*., 2009; Pérez-Pardal *et al*., 2010

Mapas físicos foram utilizados para compreender a posição dos marcadores no cromossoma Y. Para isto, foram observados o mapeamento genético gerado com o painel de híbridos de radiação (*Whole Genome-Radiation Hybrid Panel*, WG-RH; STAFUZZA *et al*., 2009) e o mapa citogenético de bandamento R (DI MEO *et al*., 2005). Segundo o mapeamento genético (STAFUZZA *et al*., 2009), o marcador INRA189 está localizado na posição 134.4 cR; o marcador BYM-1, na posição 173.1 cR; e o BM861 na posição 336 cR. A posição do marcador UMN0307 ainda não foi publicada (Fig. 2). A ordem de exposição dos resultados do presente trabalho será de acordo com a posição dos microssatélites no cromossoma. Como a posição do marcador UMN0307 ainda não foi divulgada, este virá após os demais.

Na figura 2, são mostrados os mapas genéticos, obtidos por híbridos de radiação, e mapa citogenético obtido por bandamento R (adaptado de STAFUZZA *et al*., 2009), contendo a posição de genes conhecidos e dos marcadores no cromossoma Y de taurinos. Não há resultados de mapeamento genético baseado em híbridos de radiação para o cromossoma Y de zebuínos.

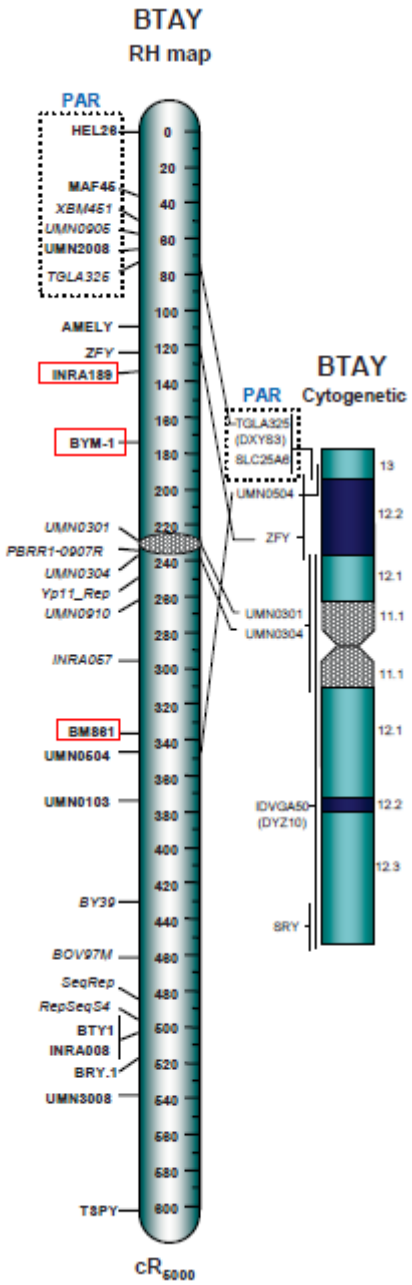

Figura 2 – Estrutura do cromossoma Y de bovinos. Mapa RH (STAFUZZA *et al*., 2009) do cromossoma Y de bovinos da espécie *Bos taurus*.(à esquerda) e ideograma citogenético (DI MEO *et al*, 2005) do cromossoma (à direita). As linhas pretas ligam os marcadores dos mapas de RH, que também foram mapeados fisicamente por FISH às suas localizações no ideograma. As caixas vermelhas indicam três dos quatro marcadores utilizados no presente estudo. As posições no mapa estão em cR5000. As distâncias correspondem às posições no mapa e as regiões pseudo-autossômicas estão indicadas em caixas pontilhadas.

Fonte: STAFUZZA *et al*., 2009, adaptado.

3.2 Alelos

Exemplos de separação em eletroforese capilar dos amplicons (e dos respectivos alelos) obtidos para os diferentes sistemas são mostrados nas figuras abaixo (de Fig. 3 a Fig. 10).

O marcador INRA189 apresentou problemas de amplificação. Doze indivíduos não amplificaram (em três tentativas); 27 (metade dos indivíduos genotipados) apresentaram dois picos na análise eletroforética, sendo um pico com tamanho de 158pb (correspondendo ao alelo alelo INRA189^{82pb} de LI *et al*., 2007; KANTANEN *et al*., 2009; GINJA *et al*., 2009; PÉREZ-PARDAL *et al*., 2011) e outro com 167 pb (correspondendo ao alelo de INRA189^{90pb} de LI *et al*., 2007; KANTANEN *et al*., 2009; GINJA *et al*., 2009; PÉREZ-PARDAL *et al*., 2011) (Fig. 3 e 4); 12 animais apresentaram somente o fragmento referente ao alelo INRA189^{90pb} (Fig. 5); e três apresentaram apenas o fragmento correspondente ao alelo INRA189^{82pb} (Fig. 6). Em relação aos indivíduos que apresentaram dois picos, para 17 deles o pico de INRA189^{90pb} apresentou altura superior ao pico de INRA189^{82pb}. No entanto, a diferença entre a altura dos mesmos foi, em geral, muito pequena (inferior a 50%). Vale ressaltar que a altura do pico correspondente ao alelo 189^{82pb} nos três indivíduos que apresentaram somente esse fragmento, foi inferior a 50, mas nos três casos o software identificou o pico como alelo.

O microssatélite BYM-1 foi bialélico, apresentando os alelos BYM-1^{258pb} e BYM-1^{260pb} (Fig. 7 e 8). Os marcadores BM861 e UMN0307, foram monomórficos, observando-se alelos de BM861^{158pb} e UMN0307^{151pb}, respectivamente (Fig. 9 e 10).

Os amplicons obtidos a partir do MegaBACE apresentaram tamanho de fragmento maior que o observado no ABI3130 para todos os sistemas utilizados, sendo observado uma diferença de aproximadamente dois pares de bases. O tamanho dos fragmentos apresentados no presente trabalho são os do MegaBACE, no qual foram feitas a maior parte das amostras.

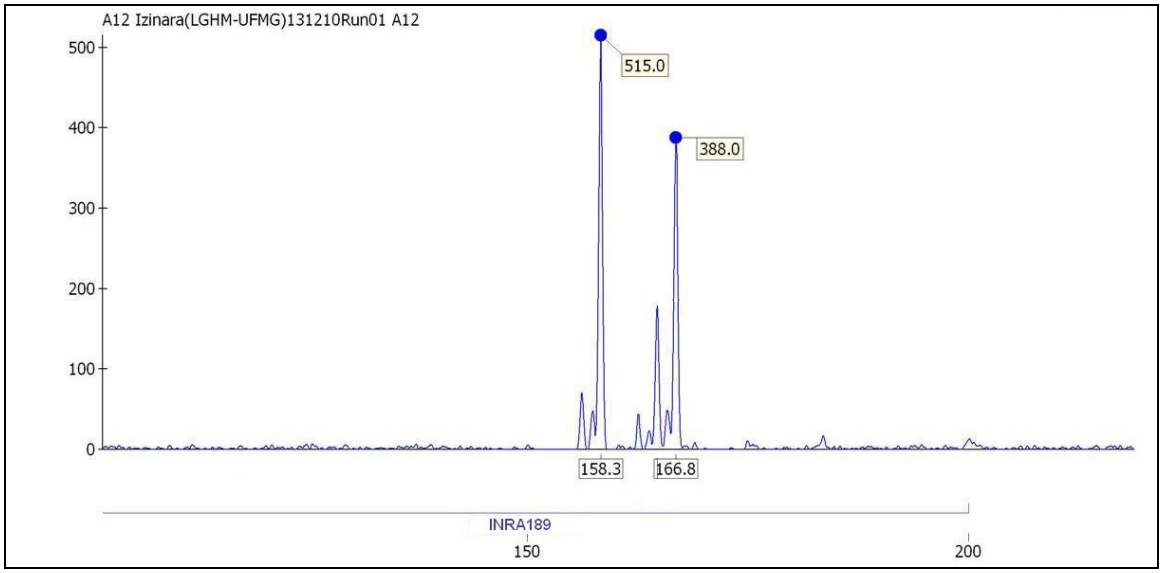

Figura 3 - Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando os picos correspondentes aos amplicons de 159 (alelo $INRA189^{82pb}$) e de 167 pb (alelo $INRA189^{90pb}$). Neste caso, a altura do pico de 159 pb é superior ao pico de 167 pb. Esta genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com o software Fragment Profile versão 1.2.

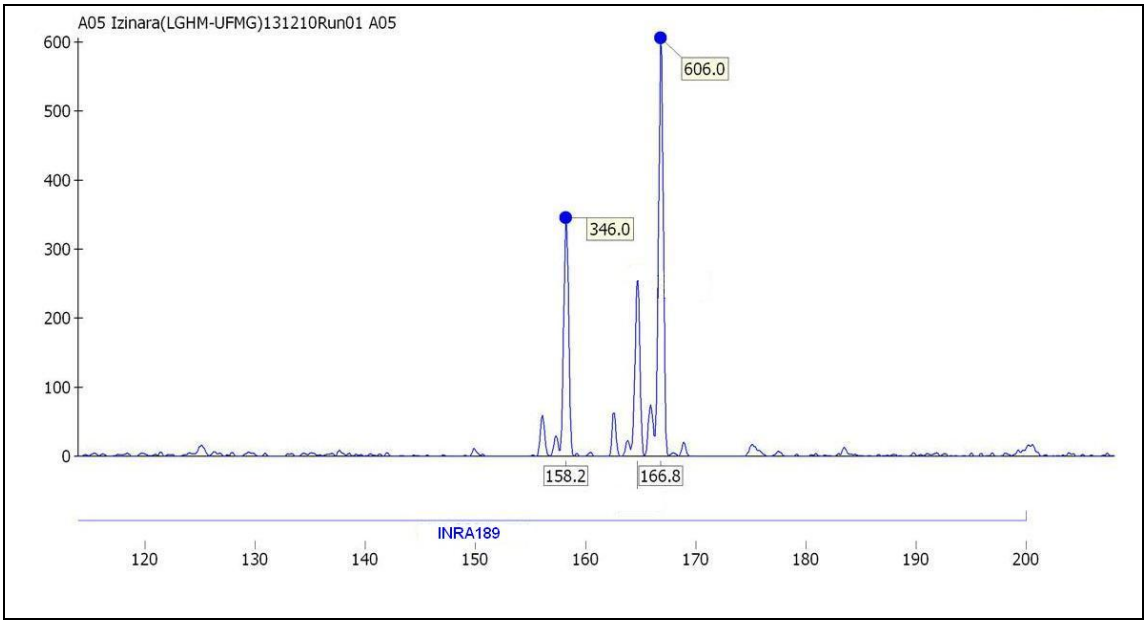

Figura 4 - Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando os picos correspondentes aos amplicons de 159 (alelo $INRA189^{82pb}$) e de 167 pb (alelo $INRA189^{90pb}$). Neste caso, a altura do pico de 167 pb é superior ao pico de 159 pb. Esta genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com o software Fragment Profile versão 1.2.

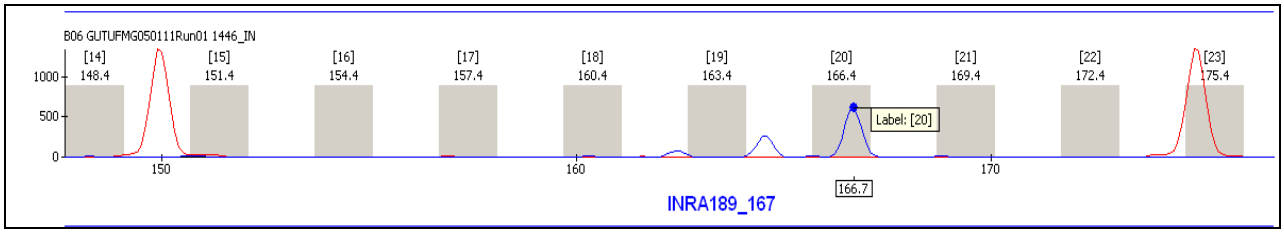

Figura 5 - Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando o pico correspondente ao amplicon de 167 pb (alelo INRA189^{90pb}). Neste exemplo, o pico de 167 pb é o único detectado pelo programa. A genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com o software Fragment Profile versão 1.2.

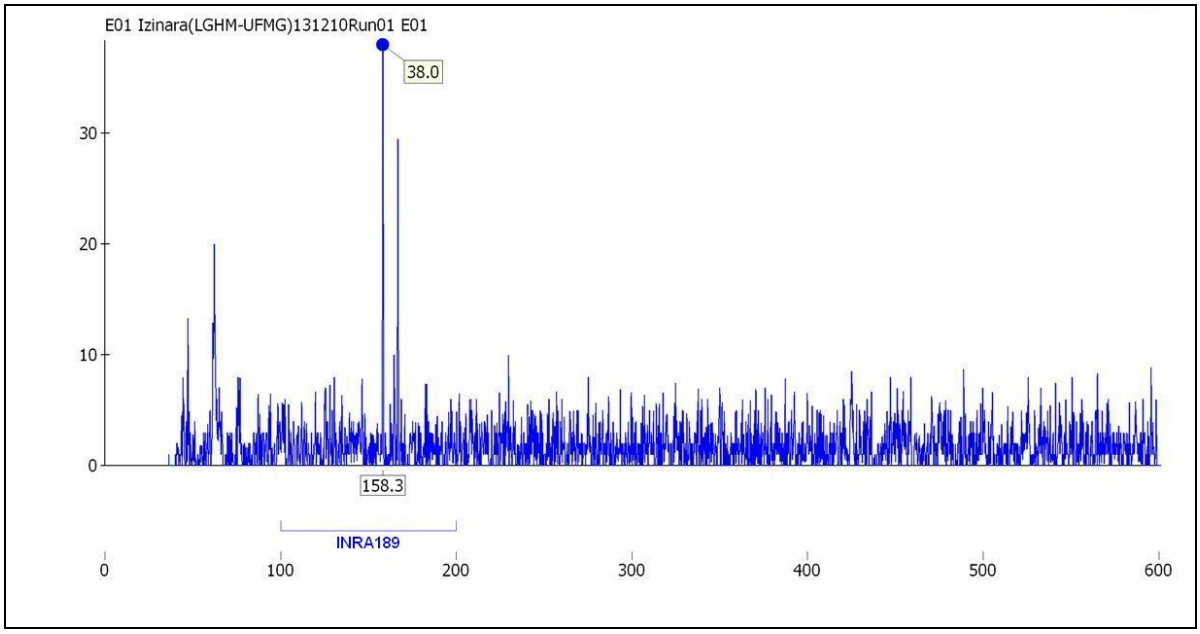

Figura 6 - Eletroferograma do marcador microssatélite INRA189, mostrando os picos correspondentes aos amplicons de 159 (alelo INRA189^{82pb}). Neste exemplo o pico do alelo INRA189^{82pb} é o único detectado pelo programa. O outro pico, presente a direita deste, corresponde provavelmente ao alelo INRA189^{90pb}. É importante salientar que a altura dos picos é muito baixa e próxima ao *background* da corrida. A genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com o software Fragment Profile versão 1.2. Este é um exemplo de resultado desconsiderado, em função da altura dos picos, embora o equipamento tenha identificado o alelo INRA189^{82pb}.

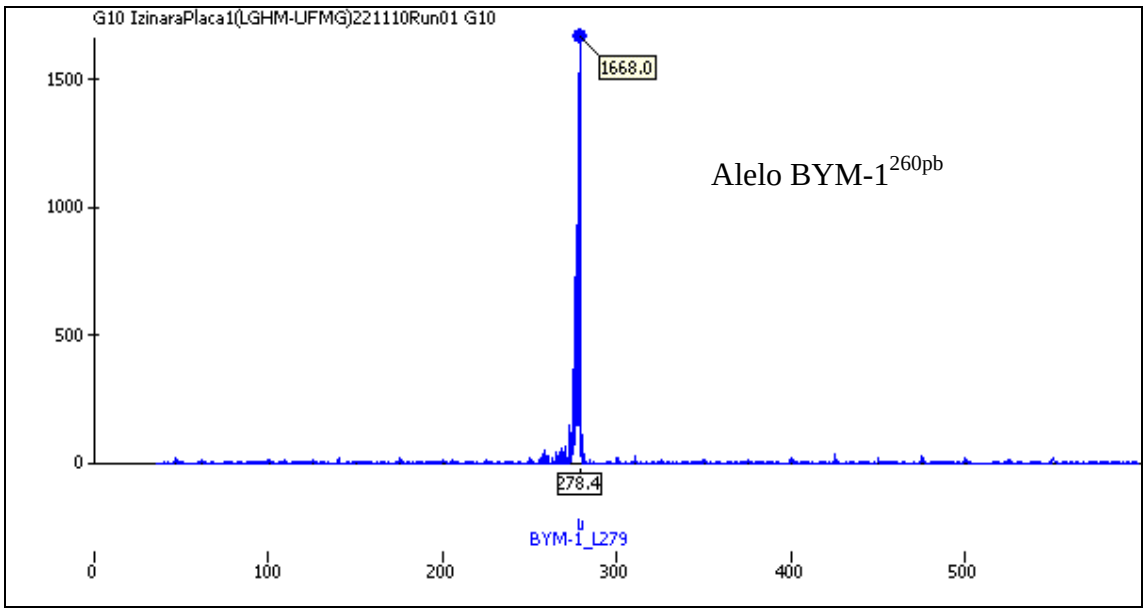

Figura 7 - Eletroferograma do marcador microssatélite BYM-1 mostrando a amplificação do alelo BYM-1^{260pb}. Do tamanho total do fragmento obtido para o marcador (279), foram descontadas as 19 pares de bases referentes à cauda M13. A genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com software Fragment Profile versão 1.2.

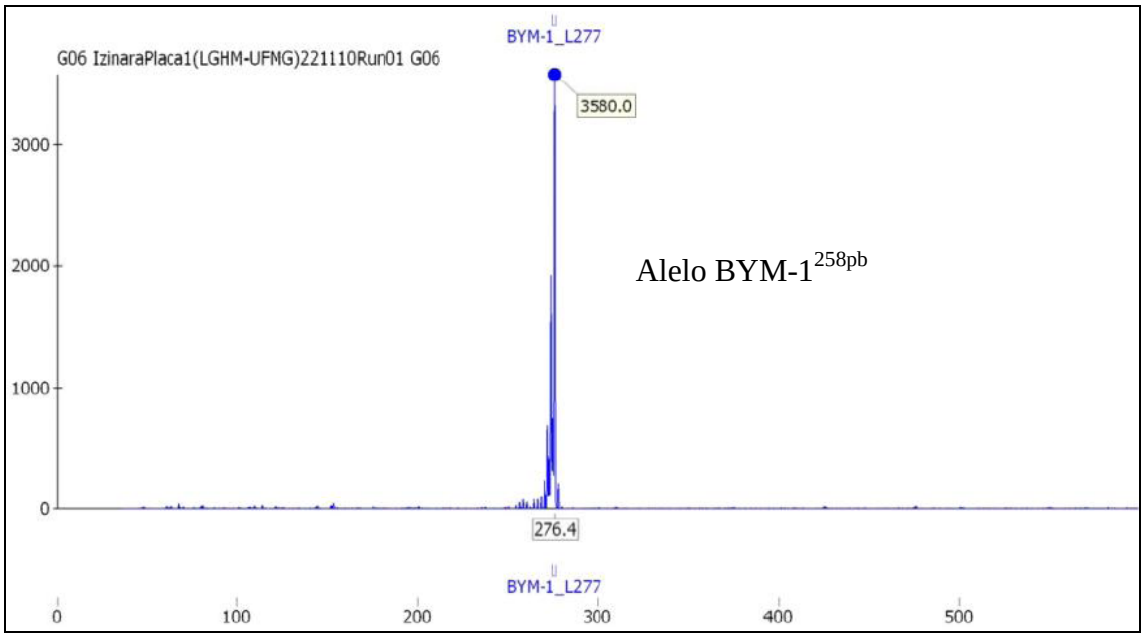

Figura 8 - Eletroferograma do marcador microssatélite BYM-1, mostrando BYM-1^{258pb}. Do tamanho total do fragmento obtido para o marcador (277pb), foram descontadas as 19 pares de bases referentes à cauda M13. A genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com o software Fragment Profile versão 1.2.

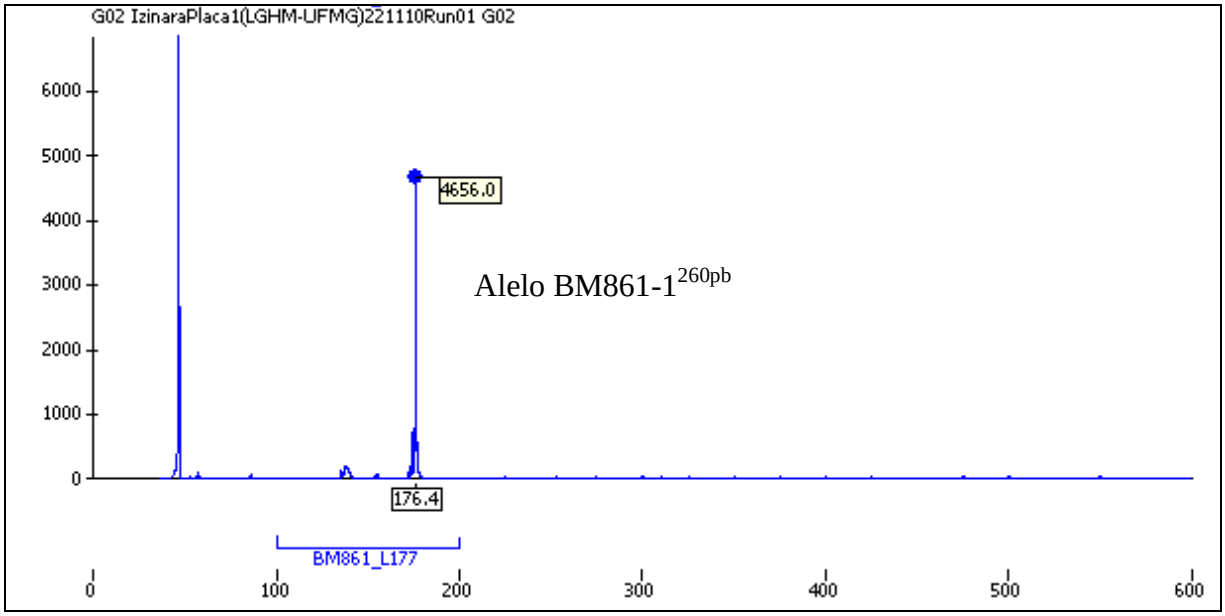

Figura 9 - Eletroferograma do marcador microssatélite BM861, alelo BM861^{158pb}. Do tamanho total do fragmento obtido para o marcador (177 pb), foram descontadas as 19 pb referentes à cauda de M13. A genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com o software Fragment Profile versão 1.2.

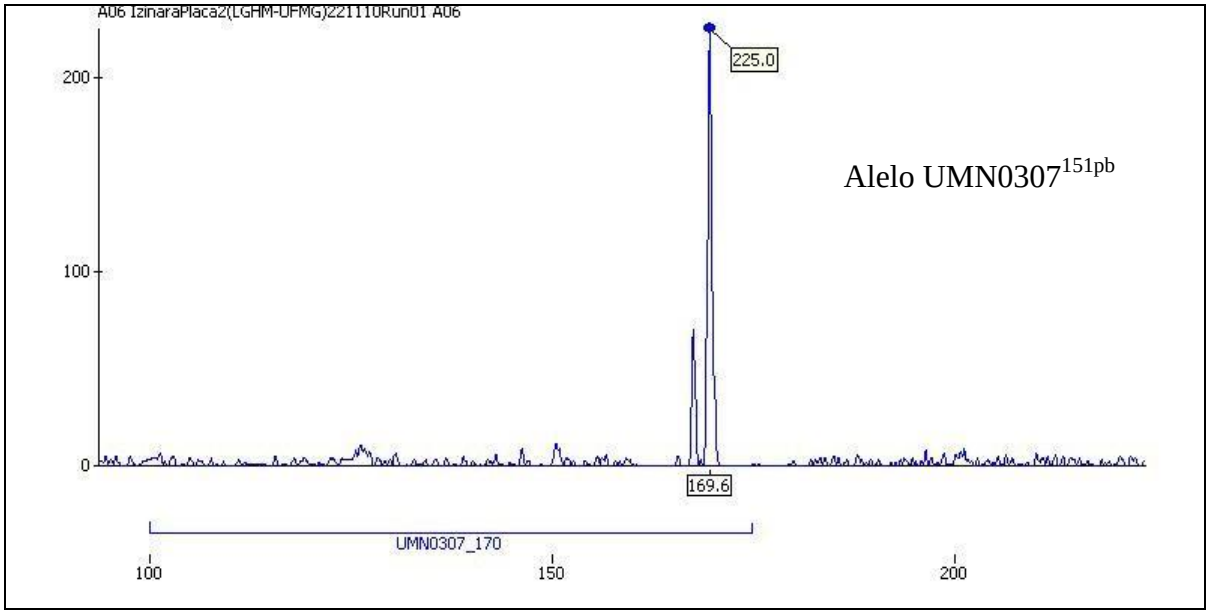

Figura 10 – Eletroferograma do marcador microssatélite UMN0307, alelo UMN0307^{151pb}. O amplicon tem 170 pb. Deste tamanho total devem ser descontadas as 19 pares de bases referentes à cauda M13. A genotipagem foi realizada utilizando-se o sequenciador MegaBACE e análise com o software Fragment Profile versão 1.2.

Os resultados referentes às características dos picos analisados são apresentados na Tab. 3. A altura média dos picos observados variou entre 29,33 (para o alelo INRA189^{82pb}) e 1285,44 (para o alelo BM861^{158pb}).

Tabela 3 Indicadores de qualidade de amplificação

Sistema	**Alelos (pb)**	**Intervalo de variação**	**Altura média de pico**	**dp**
INRA189*	82	20-38	29,33	9,01
	90	36-600	202,05	157,54
UMN0307	151	51-6000	801,34	1116,43
BM861	158	70-4656	1285,44	1188,22
BYM-1	258	70-3580	950,84	749,60
	260	199-1668	655,22	544,30

Note: dp - desvio padrão; *: Somente os picos únicos para cada alelo foram considerados.

Devido à baixa qualidade dos picos obtidos para o marcador INRA189 e também pelo fato do mesmo apresentar dois fragmentos amplificados para a maioria dos indivíduos, ele foi excluído da análise. Desta forma, a menor altura aceita para um alelo foi 51 para o UMN0307.

3.3 Frequências alélicas e haplotípicas

A frequência encontrada para os alelos BYM-1^{258pb} e BYM-1^{260pb} foi 0,83 e 0,17, respectivamente, e a diversidade gênica (equivale à heterozigosidade em marcadores autossômicos) encontrada para esse *locus* foi 0,28. Os demais marcadores foram monomórficos.

Os alelos dos três microssatélites foram combinados em haplótipos. Foram encontrados 2 haplótipos, sendo o haplótipo 1 o mais frequente, presente em 84% dos touros Guzerá genotipados (Tab. 4). Em relação à diversidade haplotípica (DH), registrou-se o valor de 0,28 ± 0,07.

Tabela 4 Haplótipos identificados em uma amostra dos principais reprodutores da raça Guzerá

			Marcadores genéticos		
Haplótipo	**N**	**%**	**BYM-1**	**BM861**	**UMN0307**
1	45	0,83	258	158	151
2	9	0,17	260	158	151

Os dois haplótipos encontrados foram comparados com as genealogias do livro de Registro Genealógico da raça, através de contato pessoal com a Drª Vania Maldini Penna e a Drª Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto. De acordo com estes dados, os 54 touros genotipados representam as 16 linhagens dos principais touros fundadores dos plantéis da raça, que participam do TP, e/ou do núcleo MOET do Guzerá e/ou do Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos da ABCZ. O haplótipo 1 foi observado em 13 das 16 famílias de touros amostradas, com um total de 1.319 filhas avaliadas (uma média de aproximadamente 34,7 filhas por touro). O haplótipo 2 foi observado em 3 famílias de touros, com um total de 195 filhas avaliadas (média de 32,5 filhas /touro).

3.4 Haplótipos de cromossoma Y e produção leiteira

Os dados referentes à DEP média de produção leiteira das filhas dos touros portadores dos diferentes haplótipos são apresentados na Tab. 5.

Tabela 5 DEP média de produção leiteira conforme haplótipo do cromossoma Y

Haplótipo	**N touros***	**Frequência Haplotípica**	**Número de filhas**	**Número médio de filhas**	**DEP média para leite****
1	38	0,83	1319	34,7	166,68
2	6	0,17	195	32,5	89,17

Note: *- número de touros para os quais os dados de número de filhas e DEP de leite foram disponibilizados no Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para leite (PEIXOTO et al, 2010); **- média em quilogramas de leite produzido/haplótipo.

Indivíduos com o haplótipo 1 apresentaram a maior DEP média para produção leiteira (média de 166,68 kg de leite). Entretanto, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as DEPs médias de produção leiteira dos touros (testadas por teste-t de *Student*), quando agrupados conforme o haplótipo. Este resultado pode ser mais claramente visualizado na Fig. 11.

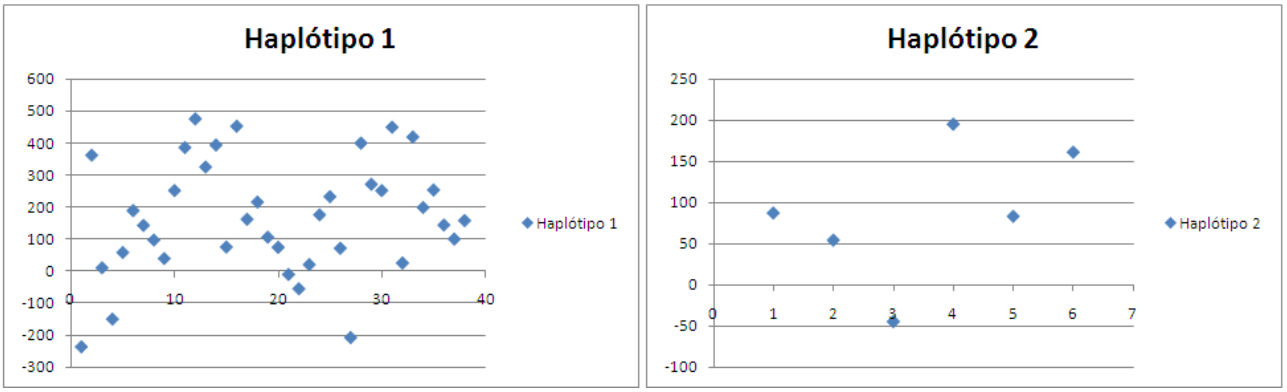

Figura 11 - Gráfico de dispersão das DEPs para produção leiteira dos touros por haplótipo. À esquerda encontra-se a dispersão das DEPs para o haplótipo 1 e à direita para o haplótipo 2. É possível confirmar, como observado através do teste-t, que não há diferença significativa entre as DEPs de produção leiteira dos touros.

4 DISCUSSÃO

4.1 Sistemas haplotípicos para o cromossoma Y bovino

Marcadores de linhagem são ferramentas interessantes para a reconstrução da evolução e da história de espécies/raças. Por exemplo, marcadores no cromossoma Y estão ajudando a entender a estrutura genética de populações dos bovinos africanos, onde se identificou a substituição de cromossomas Y de taurinos por zebuínos, acontecendo em pelo menos dois períodos de tempo (LI *et al*., 2007; XIN *et al*., 2009). Além disto, marcadores de linhagem paterna para bovinos são importantes pois permitem apreciar-se o efeito de gargalos reprodutivos provocados pela seleção inerente ao processo de melhoramento genético e que geralmente são mediados por machos (WARD *et al*., 2001; KANTANEN *et al*., 2009).

Neste estudo, avaliamos um sistema haplotípico baseado em quatro marcadores genéticos (microssatélites), para os quais há relatos na literatura informando que são polimórficos em raças zebuínas (KANTANEN *et al*., 2009; Luis J. Royo, comunicação pessoal). Um destes marcadores (INRA189), entretanto, apresentou problemas: 17 indivíduos não amplificaram, mesmo em três tentativas independentes; a altura de pico observada para os indivíduos que apresentaram um único pico para o marcador INRA189, em sua maioria, foi muito baixa e, por este motivo eles foram descartados da análise. Além disto, entre os indivíduos que apresentaram boa amplificação, identificou-se indivíduos com picos altos para ambos os alelos Fig. 3 e Fig. 4). Este achado pode ser explicado por artefato de técnica ou alternativamente, por este marcador não estar presente na região Y-específica. Embora este marcador já tenha sido usado por diversos autores, problemas semelhantes são relatados em apenas uma publicação (ver tabela 2 em Pérez-Pardal *et al*., 2011). O distúrbio de segregação observado para este marcador poderia ser explicado por:

1. Erro de mapeamento: o marcador seria autossômico ou pseudo-autossômico. Neste caso, ainda seria necessário que apresentasse alelos nulos, para explicar os casos de não amplificação;

2. O marcador seria Y-específico, mas multilocal, como outros descritos para bovinos recentemente (LIU *et al*., 2003; PÉREZ-PARDAL *et al*., 2010). Isto explicaria a presença de mais de uma banda;

3. Amplficação inespecífica;

Recentemente, dois marcadores (INRA124 e INRA126), que se acreditava mapearem na região Y-específica, foram remapeados para a PAR ou para os autossomas (PÉREZ-PARDAL *et al*., 2010). Pérez-Pardal e colaboradores (2009) testaram o padrão de segregação de alguns marcadores em DNA de fêmeas de dez famílias de bovinos (touro, vaca e bezerro) não-aparentadas, com o objetivo de esclarecer a utilidade desses microssatélites em estudos de eventos evolutivos mediados por macho em bovinos. Para maior confiabilidade do resultado, foram incluídos no estudo quatro microssatélites localizados na região pseudo-autossômica do cromossoma Y e três marcadores Y-específicos (INRA124, INRA 126 e INRA189). Os dois marcadores (INRA124 e INRA126) apresentaram o mesmo tamanho de fragmento em ambos os sexos. Após o sequenciamento, foi possível observar que o microssatélite INRA 124 mostrou compatibilidade total, sugerindo que este marcador não seja Y-específico. Já o INRA189, embora amplifique apenas em machos, amplificou nos pais e não amplificou nos filhos de 8 de 10 famílias testadas, (15 de 19 touros testados). Resultados difíceis de interpretar também foram relatados em relação ao marcador INRA126 (tabela 2 de PÉREZ-PARDAL *et al*., 2009). Alguns autores já haviam manifestado dúvidas sobre a especificidade do marcador INRA126. Produtos de PCR de mesmo tamanho foram observados em bovinos (LIU *et al*., 2003) e em yaks (Edwards *et al*., 2000). Esta amplificação dos marcadores Y-específicos em fêmeas, pode ser devido à origem comum dos cromossomas sexuais, com regiões X- e Y-específicas ainda formando sequências homólogas (EDWARDS *et al*., 2000; LIU, *et al*., 2003) ou porque estes marcadores podem estar localizados na região pseudo-autossômica do cromossoma (LI *et al*., 2007). No entanto, a amplificação em ambos os sexos sugere que estes marcadores não devem ser utilizados em estudos de eventos genéticos mediados por macho.

Para investigar se o marcador INRA189 mapeia fora da região Y-específica, seria necessário genotiparmos trios de animais, com os diferentes alelos e genótipos aqui relatados.

Na Tab. 6, é apresentada uma síntese do que foi dito acima, mostrando os alelos encontrados no presente trabalho e os encontrados pelos demais autores. É possível observar, que

o tamanho dos fragmentos encontrados para os microssatélites BM861, UMN0307 e BYM-1 também são observados nas demais referências. Foi sugerido que o alelo BM861^{158bp}, identificado na presente amostra, seja típico de taurinos (BRADLEY *et al*., 1996; Edwards *et al*., 2000; Ginja *et al*., 2009). No entanto, este alelo também foi encontrado nas amostras de zebuínos utilizadas por Li e colaboradores (2007) e Kantanen e colaboradores (2009). O fato deste alelo ainda não ter sido encontrado nas raças amostradas por aqueles autores pode ser explicado pelo pequeno número de indivíduos de raças zebuínas utilizados nos trabalhos, 15 em Edwards e colaboradores e 21 animais da raça Gir em Ginja e colaboradores. Portanto, acreditamos que não se trate de um alelo específico de taurinos.

Vários estudos usando microssatélites em animais domésticos, principalmente em bovinos, têm utilizado um número reduzido de animais da espécie *Bos indicus* na amostra e, em alguns casos, o número de marcadores também é pequeno. O presente trabalho apresenta o maior número de animais zebuínos de uma mesma raça amostrados até o momento. Além disto, este sistema de haplotipagem ainda não tinha sido testado em animais da raça Guzerá.

Tabela 6 – Tamanhos alélicos descritos na literatura e observados no presente trabalho

Publicação	Edwards et al., 2000		Ward et al., 2001		Li et al., 2007		Kantanen et al., 2009		Ginja et al., 2009		Pérez-Pardal et al., 2009		Edwards et al., 2011		Rosse et al., 2011*
Subespécie / Marcador	*Bos taurus* (12)	*Bos indicus* (15)	*Bos taurus* (41)	*Bos indicus* (0)	*Bos taurus* (31)	*Bos indicus* (21)	*Bos taurus* (395)	*Bos indicus* (10)	*Bos taurus* (586)	*Bos indicus* (28)	*Bos taurus* (608)	*Bos indicus* (0)	*Bos taurus* (2071)	*Bos indicus* (16)	*Bos indicus* (54)
INRA189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80	-	-
	-	-	-	-	-	-	82	-	-	-	-	-	-	-	82♦♦
	-	-	-	-	-	-	-	-	86	-	-	-	-	-	-
	-	88	-	-	-	88	-	88	88	88	-	-	88	88	-
	90	-	-	-	-	-	90	90	90	90	90	-	90	-	90♦♦
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94	-	94	-	-
	-	-	-	-	98	-	-	-	-	-	96	-	96	-	-
	98	-	-	-	-	-	98	-	98	-	98	-	98	-	-
	-	-	-	-	-	-	100	-	100	-	100	-	100	-	-
	-	-	-	-	-	-	102	-	102	-	102	-	102	-	-
	104	-	-	-	-	-	104	-	104	-	104	-	104	-	-
	-	-	-	-	-	-	106	-	106	-	106	-	106	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	108	-	-	-	-
BYM-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-
	-	-		-	-	-	252	-	-	-	252	-	-	-	-
	-	-	255	-	-	-	254	254	-	-	254	-	-	-	-
	-	-	257	-	256	256	256	256	-	-	256	-	-	-	258
	-	-	-	-	258	-	258	258	-	-	-	-	-	-	260
	-	-	-		-	260			-	-	-	-	-	-	
BM861	-	156	-	-	-	156	-	156	-	156♦	-	-	-	-	-
	158	-	-	-	158		158	158	158		-	-	-	-	158
	-	-	-	-	-		160	-			-	-	-	-	
UMN0307	-	-	-	-	-	-	-	-	135	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	149	149	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	151	151	-	-	-	-	151
	-	-	-	-	-	-	-	-	155	-	-	-	-	-	-

Nota:* - Resultado do presente trabalho. Manuscrito em preparação; ♦: Encontrado nas raças Brahman, Gir e Caracu; ♦♦: os alelos 82 e 90, com o conjunto de primers usado no presente trabalho geram um fragmento de 140pb e 148pb, respectivamente. Para facilitar a comparação dos resultados do sistema de haplotipagem, adotamos a mesma denominação alélica usada por Ginja et al., 2009.

Alguns autores têm incluído também, marcadores moleculares pontuais (SNPs) e/ou de inserção/deleção (ex: de sequências *Alu*), com o objetivo de melhor caracterizar o haplótipo Y-específico. Ginja e colaboradores (2009), estudando raças de bovinos portugueses, utilizaram marcadores microssatélites, SNPs e uma INDEL, porém, para as raças zebuínas, os cinco marcadores utilizados não foram polimórficos.

O pequeno número de haplótipos Y-específicos encontrados na raça está de acordo com os relatos da literatura a respeito de diversidade genética e tamanho efetivo da população da raça Guzerá no Brasil (FARIA *et al*., 2004; POGGIAN, 2008; FARIA *et al*., 2009; PANETTO *et al*., 2010; PEIXOTO *et al*., 2010).

Um padrão similar de distribuição de frequências alélicas, em que poucos haplótipos são representados em alta frequência, foi descrito em bovinos africanos (LI *et al*., 2007), em cavalos (LINDGREN *et al*., 2004; LING *et al*., 2010) e ovelhas (MEADOWS *et al*., 2006). A baixa diversidade haplotípica encontrada pode ser devido por três fatores: efeito fundador, seleção artificial ou à redução do tamanho efetivo da população masculina relacionada à seleção artificial ou aos gargalos decorrentes do processo de domesticação.

4.2 Diversidade genética

O presente trabalho é o primeiro a analisar e caracterizar um sistema haplotípico para o cromossoma Y dos principais touros utilizados como reprodutores nos rebanhos da raça Guzerá no Brasil e o número de indivíduos genotipados para a raça é maior do que na maioria dos outros estudos. Além disso, este trabalho conseguiu identificar dois haplótipos dentre os indivíduos analisados, enquanto em estudos anteriores somente um haplótipo fixado foi encontrado (EDWARDS *et al*., 2000; LI *et al*., 2007; *GINJA et al*., 2009).

A diversidade haplotípica geral encontrada no presente estudo (0.28 ± 0,07) para a raça Guzerá, foi superior à encontrada pelos demais autores para as raças zebuínas, onde os haplótipos parecem fixados (LI *et al*., 2007; GINJA *et al*., 2009; KANTANEN *et al*., 2009), porém foi inferior à encontrada pelos mesmos autores para as raças taurinas em geral (0,816 ± 0,0155, KANTANEN *et al*., 2009). Entretanto, é importante ressaltar que as amostras de zebuinos de

todos os estudos prévios são bastante pequenas (ver Tab. 6 e anexo 1). Pérez-Pardal e colaboradores (2009) utilizando cinco marcadores microssatélites Y-específicos, conseguiram indentificar 26 haplótipos em uma amostra de 405 touros (haplótipos/n = 0,064) de diversas raças taurinas e zebuinas e Kantanen e colaboradores (2009) conseguiram encontrar 13 haplótipos em 307 touros (haplótipos/n = 0,064) de diversas raças taurinas.

Até o momento, um único artigo descreve mais diversidade haplotípica em zebuínos do que a observada no presente estudo (XIN *et al*., 2009). Estes autores encontraram diversidade haplotípica de 0,9 no conjunto das raças zebuinas chinesas estudadas e diversidade gênica, variando entre 0,38 e 0,93 para cada marcador.

A baixa diversidade haplotípica encontrada aqui pode ser resultado de um efeito fundador, visto que o rebanho incial da raça começou com a importação de um pequeno número de animais da Índia para o Brasil no período entre o fim do século XIX e o início do século XX. Após este período, não foi registrada nenhuma outra introdução de material genético neste rebanho, além de ter ocorrido uma diminuição no número efetivo de animais. Somente vinte anos depois, o número de animais volta a apresentar crescimento, devido ao uso de fertilização *in vitro* e transferência de embrião (PANETO *et al*., 2008; PANETTO *et al*., 2010). Como consequência de ser um grupo fechado e ter um pequeno número de fundadores, um estudo realizado recentemente relatou que, entre os 9.915 animais registrados no Livro Registro Genealógico desta raça, 91,3% (9.055) tiveram um coeficiente de endogamia diferente de zero. A média do coeficiente de endogamia para a raça foi 15.2% (PANETTO *et al*., 2010).

Esta baixa diversidade observada pode ser também devida à baixa informatividade do sistema aqui testado, visto que apenas um dos marcadores do sistema haplotípico apresentou variação alélica.

4.3 Análise das genealogias

O genótipo de todos os indivíduos analisados correspondem aos dados de linhagem obtidos a partir das informações do Livro de Registro Genealógico da raça. No entanto, o número de linhagens identificadas através dos haplótipos Y-específicos é menor que o de famílias no livro de registro, sendo que o haplótipo 1 aparece em 13 das 16 famílias analisadas. Tal fato pode ser

devido ao efeito fundador e, em grande parte, devido à grande utilização de um número reduzido de touros com valor genético elevado como reprodutores nos rebanhos ou da baixa informatividade do sistema haplotípico.

Este estudo permitiu a avaliação de um sistema haplotípico em uma raça zebuína brasileira.

4.3 Perspectivas

Para aumentar a eficiência de caracterização haplotípica do sistema, será necessário acrescentar novos marcadores (microssatélites, INDELs e SNPs), como os microssatélites usados em amostras maiores de zebuínos por Xin e colaboradores (2009) ou os marcadores multilocais descritos recentemente por Pérez-Pardal e colaboradores (2011). Além disto, seria importante genotipar touros pertencentes a uma amostra aleatória da população da raça Guzerá. Essa estratégia permitiria avaliar a diversidade Y-haplotípica dos touros dos rebanhos em geral e futuramente estimar de maneira mais precisa a diversidade genética contida no cromossoma Y da raça no Brasil.

5 CONCLUSÕES

O marcador genético INRA189 apresenta distúrbios de segregação que dificultam sua inclusão em um painel de marcadores para haplotipagem do cromossomo Y;

Os marcadores BM861, BYM-1 e UMN0307 permitiram a composição de um sistema haplotípico inicial, levando a identificação de dois haplótipos entre os animais amostrados (BYM-1^{258pb} - $BM861^{158pb}$ - $UMN0307^{151pb}$ e BYM-1^{258pb} - $BM861^{160pb}$ - $UMN0307^{151pb}$).

Os dois haplótipos do cromossomas Y observados entre os principais reprodutores do rebanho da raça, permitiram separar as 16 famílias de touros participantes do programa de melhoramento em dois grupos.

Uma baixa diversidade Y-haplotípica (0,28 ± 0,07) foi encontrada nos touros pertencentes aos programas de melhoramento genético da raça Guzerá, o que pode levar a uma redução no tamanho efetivo da população e maior efeito da deriva genética na diversidade Y-cromossômica.

O sistema haplotípico precisa ser ampliado, com a inclusão de maior número de marcadores, para atingir-se uma ferramenta eficiente para a monitorização de eventos evolutivos mediados por machos em zebuínos.

6 REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS E BIBLIOGRÁFICAS

1. http://www.abcz.org.br

2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3. http://www.fluxus-technology.com

4. http://www.progenygenetics.com/on-line-pedigree

5. http://www.minitab.com

ALMEIDA, S.E.M. et al. Genetic diversity in Brasilian bovine herd based on four microssatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, n.23, v.2, p.345-350, 2000.

ALVIM, J.M. et al. Sistema de produção, 7. **Embrapa Gado de Leite**. Juiz Fora, 2005. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/sistema/7/introducao.html>. Acessado em: 10 dez. 2010.

ANDERUNG, C. et al. Investigation of X- and Y-specific single nucleotide polymorphisms in taurine (*Bos taurus*) and indicine (*Bos indicus*) cattle. **Animal Genetics**, 38, 595-600, 2007.

ANDREAZZA, M.C. Aplicação de Microssatélites (STR) de Bovinos em Animais de Raça Zabuína. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2006.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Mol. Biol. Evol**. 16(1):37-48, 1999.

BARBAT, A. et al. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement. **J. Reprod. Dev.** Suppl: S15-21, 2010.

BEZERRA, J.A. Raças zebuínas no Brasil. 2007. Disponível em: <http//globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/183/rep_pecuaria.htm>. Acessado em 15 maio 2009.

BISHOP, M.D. et al. A Genetic Linkage Map for Cattle. **Genetics** 136: 619-639, 1994.

BITA NICKKHOLGH, M.D. et al. Y chromosome TSPY copy numbers and semen quality. **Fertil Steril**, 94:1744-7, 2010.

BOSCH, E. et al. Variation in short tandem repeats is deeply structured by genetic background on the human Y chromosome. **Am. J. Hum. Genet.** 65, 1623-1638, 1999.

Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, 324(5926), 522-8, 2009.

BRADLEY, D.G. et al. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, 93, 5131-5, 1996.

BRADLEY, D.G. et al. Zebu-taurine variation in Y chromosomal DNA: a sensitive assay for genetic introgression in west African trypanotolerant cattle populations. **Animal Genetics** 25, 7-12, 1994.

CAMPOS, L.C.C. Guzerá. **Núcleo de Estudos em Pecuária de Corte** – Universidade Federal de Lavras – Departamento de Zootecnia – Lavras – MG. 2006. Disponível em: <http://www.nucleoestudo.ufla.br/nepec/guzera.htm>. Acessado em 03 jun. 2009.

CAÑON, J. et al. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. **Genetic Selection and Evolution** 33, 311-32, 2001.

CARAMELLI, D. The origins of domesticated cattle. **Human Evolution**, 21, 107-122, 2006.

CERVINI, M. Mapeamento de QTL nos cromossomos 24 e 29 para medidas de peso, resitência a carrapato e estresse térmico em uma população F_2 (Gir X Holandês). 2009. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, SP, 2009.

DI MEO, G.P. et al. Chromosome evolution and improved cytogenetic maps of the Y chromosome in cattle, zebu, river buffalo, sheep and goat. **Chromosome Research** 13: 349-355, 2005.

DOBSON, H. et al. The high producing dairy cow and its reproductive performance. **Reprod. Domest. Anim.** 42:17-23, 2007.

ECK, S.H. et al. Whole genome sequencing of a single Bos taurus animal for single nucleotide polymorphism discovery. **Genome Biology**, 10:R82, 2009.

EDWARDS, C.J. et al. Dual Origins of Dairy Cattle Farming – Evidence from a Comprehensive Survey of European Y-Chromosomal Variation. **PloS ONE** 6(1):315922, 2011.

EDWARDS, C.J.; BAIRD, J.F.; MACHUGH, D.E. Taurine and Zebu admixture in Near Eastern cattle: a comparison of mitochondrial, autosomal and Y-chromosomal data. **Animal Genetics**, n. 38, p. 520-524, 2007.

EDWARDS, C.J. et al. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. **Animal Genetics**, n.31, 127-130, 2000.

ELLEGREN H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends Genet.** 16: 551-558, 2000.

FAO. The State if the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture – in brief. Rome, 2009.

FAO. The State if the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture – in brief. Rome, 2007. p. 11-17.

FARBER, R.A. et al. Instability of simple sequence repeats in a mammalian cell line. **Hum. Mol. Genet.** 3: 253-256, 1994.

FARIA, F.J.C. et al. Variabilidade genética da raça Guzerá. V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. 2004. Disponível em: <http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/trabalhos/pdfs/bc050.pdf>. Acessado em: 21 dez. 2010.

FARIA, F.J.C. et al. Pedigree analysis in the Brazilian Zebu breeds. **J. Anim. Breed. Genet.** 126:148-153, 2009.

FARIA, F.J.C. Estrutura genética de populações zebuínas brasileiras registradas. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2002. 177p. Tese Doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

GARCÍA-ISPIERTO, I. et al. Fatores affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. **Theriogenology,** n. 67, p. 632-638, 2007.

GINJA, C.; DA GAMA, L.T.; PENEDO, M.C. Analysis of STR markers reveals high genetic structure in Portuguese native cattle. **Journal of Heredity**, 201-210, 2010.

GINJA, C. et al. Origins and genetics diversity of new world creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. **Animal Genetics**, 41, 128-141, 2009a.

GINJA, C.; GAMA, L.T.; PENEDO, M.C. Y chromosome haplotype analysis in Portuguese cattle breeds using SNPs and STRs. **Journal of Heredity**, 148-157, 2009.

GIOVAMBATTISTA G. et al. Male-mediated introgression of Bos indicus genes into Argentine and Bolivian creole cattle breeds. **Animal Genetics** 31, 302-5, 2000.

HANOTTE, O. et al. Geographic distribution and frequency of a taurine Bos Taurus and an indice Bos indicus Y specific allele amongst sub-saharan African cattle breeds. **Molecular Ecology** 9, 387-96, 2000.

HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science** 82-83, 349-360, 2004.

HARR, B.; SCHLÖTTERER, C. Long microsatellite alleles in Drosophila melanogaster have a downward mutations bias and short persistence times, wich cause their genome-wide underrepresentation. **Genetics** 155:1213-1220, 2000.

HELBORG, L. & ELLEGREN, H. Low levels of Nucleotide Diversity in Mammalian Y Chromosomes. **Molecular Biology and Evolution**, 21:158-163, 2004.

HERING, S. et al. DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. **Int. J. Legal Med.** V.120, p.337-345, 2006.

HEYER, E. et al. Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. **Hum Mol Genet** 6:799-803.

HODGES J. The management of global animal genetic resources, FAO Animal Production Health Paper 104, Proceedings of FAO Expert Consultation, Rome, April, 1992.

HURLES M.; JOBLING, M. Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y. **Mol Ecol**. 10:1599-1613, 2001.

JORDANA, J. et al. Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 120, 73-87, 2003.

JORGE W. et al. Caracterização genética de bovinos por meio de estudos do cromossomo Y do DNA mitocondrial. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006.

JOSAHKIAN L.A. Programa de Melhoramento Genético das Raças Zebuínas. III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2003.

KANTANEN, J. et al. Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (Bos Taurus). **Heredity** 103, 404-415, 2009.

KAPPES, S.M. et al. A Second-Generation Linkage Map of the Bovine Genome. **Genome Research**, n. 7, p. 235-249, 1997.

KAYSER, M. et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. **Int. J. Legal Med.** 110: 125-133, 1997.

KAYSER, M. et al. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. **Am. J. Hum. Genet.** 66:1580-1588, 2000.

KAYSER M.; SAJANTILA, A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. **Forensic Sci Int** 118: 116-121, 2001.

KIM, K.S.; YEO, J.S.; CHOI, C.B. Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. **Animal Genetics** 33, 201-4, 2002.

LI, M.H. et al. Reduced genetic structure of north Ethiopian cattle revealed by Y-chromosome analysis. **Heredity** 98, 214-221, 2007.

LINDGREN, G. et al. Limited number of patrilines in horse domestication. **Nature Genetics** 36, 335-336, 2004.

LING, Y. et al. Identification of Y Chromosome Genetic Variations in Chinese Indigenous Horse Breeds. **Journal of Heredity** 101(5):639-643, 2010.

LIRÓN, J.P.; PERAL-GARCÍA, P.; GIOVAMBATTISTA, G. Genetic Characterization of Argentine and Bolivian creole cattle breeds assessed through microsatellites. **Journal of Heredity**, 331-339, 2006.

LIU, W.S.; BEATTIE, C.W.; PONCE DE LEÓN, F.A; Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. **Cytogenet Genome Res**, n.102, p. 53-58, 2003.

LIU W.S. et al. A radiation hybrid map for the bovine Y chromosome. **Mammalian Genome** 13, 320-6, 2002.

LOFTUS R.T. et al. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, 91, 2757-61, 1994.

LÓPEZ-GATIUS, F. et al. Screening for high fertility in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, n. 65, p. 1678-1689, 2006.

MACHADO M.A.; SHUSTER I.; MARTINEZ M.L.; CAMPOS A.L. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. **R. Bras. Zootec.**, 32,p. 93-98, 2003.

MACHUGH D.E. et al. Microssatellite DNA Variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of Taurine and Zebu Catlle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics Society of American**, n. 146, p. 1071-1086, 1997.

MAO, Y. et al. Genetic Structure and differentiation of three Chinese Indigenous cattle populations. **Biochemical Genetics**, v.45, 2007.

MARSON E.P. et al. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. **Genetics and Molecular Researches**, 4(3), p. 496-505, 2005.

MARTINS, T.M.V. Y-miniSTR: alternative para a análise de amostras "complicadas". 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto. Porto, Portugal, 2008.

MAUDET, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. **Journal of Animal Science** 80, 942-50, 2002.

MELO V.M.M. Nova tendência: crescimento dos sistemas de duplo propósito fará do Guzerá a "bola da vez" da pecuária. 2006. Disponível em: <http://www.guzeramoet.com.br/artigo_virgilio.htm>. Acessado em 19 maio 2009.

METTA, M. et al. Genetic characterization of the Indian cattle breeds, Ongole and Deoni (*Bos indicus*), using microsatellite markers – a preliminary study. **BMC Genetics** 5, 16, 2004.

MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKI, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. **Nucleic Acids Research**, n.16, p.1215, 1988.

MUKESH, M.et al. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellites. **J. Anim. Breed. Genet**. 121, 416-424, 2004.

NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics. University Press, New York, 1987.

PANDEY, A.K. et al. Genetic diversity studies of kherigarh cattle based on microsatellite markers. **J. Genet**. 85, 117-122, 2006.

PANETO, J.C. et al. Bos indicus or Bos Taurus mitochondrial DNA – Comparison of productive and reproductive breeding values in a Guzerat dairy herd. **Genet. Mol. Res.** 7:592-602, 2008.

PANETTO, J.C.C. et al. Assessment of inbreeding depression in a Guzerat dairy herd: Effects of individual increase in inbreeding coefficients on production and reproduction. **J. Dairy Sci.** 93: 4902-4912, 2010.

PEIXOTO, M.G.C.D. et al. Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite: resultados do Teste de Progênie, do Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos da ABCZ e do Núcleo MOET. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2010.

PEIXOTO, M.G.C.D. et al. Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite: resultados do Teste de Progênie, do Arquivo Zootécnico e do Núcleo MOET. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 11-28, 2009.

PEIXOTO, M.G.C.D. et al. Genetic trend for milk yield in Guzerat herds participating in progeny testing and MOET nucleus schemes. **Genetics and Molecular Research**, 5:454-465, 2006.

PENNA, V.M. et al. Situação atual e potencialidade da raça Guzerá na pecuária leiteira nacional. 2006. Disponível em: <http://www.fernandomadalena.com/site_arquivos/1003.pdf>. Acessado em: 27 dez. 2010.

PENNA, V.M.; PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S. O programa de melhoramento da aptidão leiteira da raça Guzerá. 2008. Disponível em: <http://www.guzeraibituruna.com.br/textooprograma.html>. Acessado em: 21 dez. 2010.

PENNA, V.M.; MADALENA, F.E.; ALVIM, M.T.T. Open MOET selection nucleus in Guzerá. In: World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, 6., 1998, Armidale Proceedings… Armidale: WCGALP, p. 439, 1998.

PÉREZ-PARDAL, L. et al. Multiple paternal origins of domestic cattle revealed by Y-specific interspersed multilocus microsatellites. **Heredity** 105, 511-519, 2010.

PÉREZ-PARDAL, L. et al. Y-specific microsatellites reveal na African subfamily in taurine (Bos Taurus) cattle. **Animal Genetics** 41, 232-241, 2009.

POGGIAN, C.F. Variabilidade Genética e Endogamia na População Guzerá sob Seleção para Produção de Leite. 2008. Dissertação de Mestrado, UFJF, Juiz de Fora, MG, 2008.

Produção da Pecuária Municipal 2007. Rio de Janeiro: IBGE, v. 35, 2007. Acompanha 1 CD-ROM.

SANTIAGO, A.A. Os cruzamentos na pecuária bovina. São Paulo; Intituto de Zootecnia, São Paulo, SP, p. 549, 1975.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Res.** 20: 211-215, 1992.

SHUELKE MARKUS. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v.18, p. 232-234, 2000.

SKALETSKY. H. et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature** 423, 825-37, 2003.

STRANZINGER, G.F. et al. Y chromosome polymorphism in various breeds of cattle (*Bos taurus*) in Switzerland. **J. Appl. Genet** 48(3), p. 241-245, 2007.

TAMBASCO, D.D. et al. Caracterização Molecular de Animais da raça Nelore utilizando Microssatélites e genes Candidatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29 (4), p. 1044-1049, 2000.

TEODORO, R.L. et al. 2007. Estrutura genética da raça Guzerá (*Bos indicus*) selecionada para leite no Brasil. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA, Cusco, Peru, CD-ROM.

TEODORO, R.L. et al. Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite: resultado do Teste de Progênie, do Arquivo Zootécnico e do Núcleo MOET. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003.

UNDERHILL, P.A.; KIVISILD, T. Use of Y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. **Annu. Rev. Genet**. 41, 539-564, 2007.

VAIMAN, D. et al. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. Mammalian Genoma 5, 288-97, 1994.

VERKAAR, E.L. et al. Paternally inherited markers in bovine hybrid populations. **Heredity** 91, 565-9, 2003.

VIEIRA, H.C.M. et al. Estudo da endogamia em bovinos da raça Guzerá participantes de programa de melhoramento genético. Anais da 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Goiânia, GO, 2005. CD-Rom.

WARD, T.J. et al. Differential introgression of uniparentally inherited markers in bson populations with hybid ancestries. **Animal Genetics**, 32, 89-91, 2001.

WEBER, J.L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Hum. Mol. Genet.** 2: 1123-1128, 1993.

XIN, C. et al. Polymorphisms of two Y chromosome microsatellite in Chinese cattle. **Genet. Sel. Evol**., n.38, p. 525-534, 2009.

XU, X.; PENG, M.; FANGET, Z. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. **Nat. Gen.** 24: 3396-399, 2000.

7 ANEXOS

Anexo I – Tabela contendo as raças estudadas pelos autores citados durante o presente trabalho

Autor	Raças taurinas	Raças zebuínas	Demais indivíduos
Edwards et al, 2000	Hereford (6); N'Dama (6)	Nelore (12); Ongole (3)	Plains bison (6); Mithan (11); Swap buffalo (6); Yak (6); Togo sheep (3)
Ward et al, 2001	Angus (10); Hereford (16); Hostein (5); Shorthon (10)		Antelope Island State Park (10); Custer State Park (19); Elk Island National Park (21); Finney State Game Refuge (13); Henry Mountains (7); Maxwell State Game Refuge (25); Mackenzie Bison Sanctuary (14); National Bison Range (17); Williams Ranch (3); Wood Buffalo National Park (14);
Li et al, 2007	Holstein-Friesian (31)	Begait (21)	Sanga: Afar (18); Raya (14); Zenga: Arado (20); Fogera (19); Abergelle (20); Irob (18)

Anexo I – Tabela contendo as raças estudadas pelos autores citados durante o presente trabalho (continuação)

Autor	**Raças taurinas**	**Raças zebuínas**	**Demais indivíduos**
Kantanen et al, 2009	Raças europeias: Byelorussian Red (22); Danish Red (15); Danish Jersey (12); Jutland breed (6); Estonian Red (10); Estonian Native (10); Faroe Islands Cattle (3); Finnish Ayrshire (14); Finnish Holstein-Friesian (11); Eastern Finncattle (11); Northern Finncattle (3); Western Finncattle (9); German Simmental (3); Icelandic Cattle (11); Latvian Brown (8); Latvian Danish Red (10); Latvian Blue (9); Lithuanian Red (9); Lithuanian Black-and-White (10); Lithuanian Light Grey (10); Lithuanian White Backed (10); Norwegian Red Cattle (NRF) (12); Western Red Polled (Norway) (4); Eastern Red Polled (Norway) (6); Doela Cattle (Norway) (4); Troender Cattle (Norway) (7); Telemark (Norway) (2); Western Fjord Cattle (Norway) (6); Polish Holstein-Friesian (10); Suksun (Russia) (5); Istoben (Russia) (9); Pechora type (Russia) (7); Kholmogory (Russia) (8); Yaroslavl (Russia) (4); Red Gorbatov (Russia) (2); Yurino (Russia) (6); Yakutian Cattle (Russia) (17); Busa (Serbia) (5); Podolian (Serbia) (4); Swedish Red Polled (5); Swedish Mountain Cattle (9); Fjall Cattle (Sweden) (4); Ukrainian Whitehead (11); Ukrainian Grey (7); Near-Eastern: Anatolian Black (Turkey) (6); East Anaolian Red (Turkey) (4); South Anatolian Red (Turkey) (4); Turkish Grey (4); Damascus (Syria) (5); Middle Iraqi (5); North Iraqi (3); South Iraqi (4)		

Anexo I – Tabela contendo as raças estudadas pelos autores citados durante o presente trabalho (continuação)

Autor	**Raças taurinas**	**Raças zebuínas**	**Demais indivíduos**
Ginja et al, 2009	Arouquesa (16); Barrosa (16); Cachena (16); Marinhoa (16); Maronesa (16); Minhota (15); Mirandesa (16); Alentejana (16); Brava de Lide (16); Garvonesa (16); Mertolenga (16); Preta (16); Mostrenca (16); Iberian Peninsula (207); Ramo Grande (16); Canaria (15); Palmera (14); Atlantic Islands (45); Argentino1&2 (23); Baja California (20); Caracu (10); Chiapas (15); Chihuahua (19); Poblano (16); Nayarit (16); Pampa Chaqueno (16) Texas Longhorn (16); Creoles (151); Angus (27); British White (10); Hereford (25); Jersey (18); Shorthorn (9); British Islands (89); Charolais (16); Friesian (16); Limousin (16); Continental Europe (48);	Gir (21); Brahman (7)	

Anexo I – Tabela contendo as raças estudadas pelos autores citados durante o presente trabalho (continuação)

Autor	**Raças taurinas**	**Raças zebuínas**	**Demais indivíduos**
Pérez-Pardal et al, 2009	Alistana Spain (9); Angus UK (13); Asturiana de la Montana Spain (19); Asturiana de los Valles Spain (38); Blanc-Bleu Belge Belgium (15); Atlantic Europe (15); Berrenda Spain (4); Betizu Spain (10); Blonde d'Aquitaine France (5); Brown Swiss Switzerland (14); Bruna dels Pirineus Spain (11); Bovin d_Oulmes Morocco (5); Mediterranean Africa (5); Bovin de Tidili Morocco (5); Charolais France (5); Chianina Italy (20); Croatian Simmental Croatia (13); Danish Red Denmark (10); Dexter Ireland (4); Fleckvieh Switzerland (4); European Friesian Germany (8); Galloway UK (2); Hereford UK (8); Holstein The Netherlands (37); Istrian Croatia 4 Balkan Peninsula (4); Jersey The Netherlands (5); Toro de Lidia Spain (65); Limousin France (4); Lobi Burkina Faso (8); Sub-Saharan Africa (8); Maremmana Italy (19); Morucha Spain (17); N_Dama Guinea (9); Normande France (39); Pajuna Spain (4); Parda de Montana Spain (26); Parthenais France (15); Piemontese Italy (6); Pinzgauer Austria (9); Pirenaica Spain (10); Retinta Spain (6); Rubia Gallega Spain (31); Salers France (15); Sayaguesa Spain (4); Serrana Negra Spain (3); Simmenthal Germay (4); Tarentaise France (18); Tudanca Spain (8); Tyrolean Grey Austria (19)		

Anexo I – Tabela contendo as raças estudadas pelos autores citados durante o presente trabalho (continuação)

Autor	Raças taurinas	Raças zebuínas	Demais indivíduos
Edwards et al, 2011	N'Dama Guinea (12); Anatolian Black Turkey(5); Damascus DAM Syria (3); East Anatolian Red Turkey (4); Middle Iraqi Iraq (4); North Iraqi Iraq (1); South Iraqi Iraq (3); South Anatolian Red Turkey (4); Chianina CHI Italy (20); Istrian Croatia (4); Marchigiana Italy (11); Maremmana Italy (19); Podolica Italy (13); Serbian Podolica Serbia (4); Turkish Grey Turkey (3); Ukrainian Grey (5); Alanteja (34); Alistanasanabresa (12); Arouquesa Portugal (33); Asturiana de los Valles Spain (38); Asturiana de Montana Spain (19); Avilena Negro Iberica Spain (7); Barrosa BAR Portugal (33); Berrenda Spain (5); Betizu Spain (17); Brava de Lide Portugal (26); Cachena Portugal (25) Garvonesa Portugal (6); Lidia Spain (66); Mallorquina Spain (8); Marinhoa Portugal (17); Maronesa Portugal (23) Mertolenga Portugal (21); Minhota Portugal (28); Mirandesa MIR Portugal (23); Morucha Spain (5); Mostrenca Spain (21); Pajuna Spain (4); Preta Portugal (29); Retinta Spain (6); Rubia Gallega Spain (44); Sayaguesa Spain (8); Tundanca Spain (10); Blonde d'Aquitaine France (5); Bruna de los Pirineds Spain (11); Busha Serbia (5); Cabannina Italy (2); Charolais France (31); Limousin France (24); Montbeliard France (6); Parthenaise France (15); Piemontese Italy (13); Pinzgaur Austria (9); Pirenaica Spain (10); Pustertaler Italy (13); Salers France (20); Simmental Switzerland (15); Swiss Brown Switzerland (14); Tarentaise France (18); Tyrolean Grey Italy (19); Aberdeen Angus Scotland (27); Ayrshire Scotland (16); British White England (21); Dexter Ireland (4); Galloway Scotland (9); Hereford England (21); Highland Scotland (10); Jersey Jersey (19); Blacksided Troender Norway (7); Doela DOL Norway (4); Eastern Finncattle Finland (9); Eastern Red Polled Norway (5); Fjallnara Sweden (3); Icelandic Iceland (8); Northern Finncattle Finland (3); Norwegian (commercial, hybrid) Norway (12); Swedish Mountain Sweden (8); Swedish Red Polled Sweden (3); Telemark Norway (2); Western Finncattle Finland (9); Western Fjord Norway (6); Western Red Polled Norway (3); Angler ANG Germany (10); Danish Red Denmark (19); Latvian Blue (native) Latvia (9); Latvian Brown (commercial) Latvia (8); Latvian Danish Red Latvia (7); Suksunskaya SUK Russia (5); Ukrainian Red Steppe Ukraine (5); Belgian Blue France (21); Belgian Red Belgium (4); Normand France (46); Shorthorn Belgium (19); Dutch Belted Netherlands (8); Friesian-Dutch Netherlands (8); German Original Black Pied-West Germany (3); Groningen Whitehead Netherlands (6); Holstein Friesian Netherlands (65); Jutland (old native) Denmark (6); Meuse-Rhine-Yssel Netherlands (9); Red Holstein dual type Netherlands (1); Bestuzhev Russia (4); Istobenskaya Russia (9); Kalmyk Russia (12); Kholomogorskaya Russia (6); Pechorskaya Russia (7); Ukrainian Whiteheaded Ukraine (11); Yakutian cattle Siberia (23); Yaroslavskaya Russia (3);	Ongole (4); Nelore (12)	