

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**ESTRUTURAÇÃO GENEALÓGICA PARA PROPOSTAS DE
ACASALAMENTOS EM REBANHOS DAS RAÇAS CURRALEIRO PÉ-
DURO E PANTANEIRO**

Bruna Paula Alves da Silva

Orientador: Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno

GOIÂNIA

2017



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

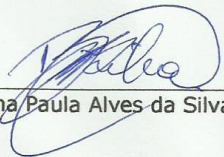
Nome completo do autor: Bruna Paula Alves da Silva

Título do trabalho: Estruturação genealógica para propostas de acasalamentos em rebanhos das raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Bruna Paula Alves da Silva²

Data: 23 / 04 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

² A assinatura deve ser escaneada.

BRUNA PAULA ALVES DA SILVA

**ESTRUTURAÇÃO GENEALÓGICA PARA PROPOSTAS DE
ACASALAMENTOS EM REBANHOS DAS RAÇAS CURRALEIRO PÉ-
DURO E PANTANEIRO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Zootecnia junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Produção Animal

Linha de Pesquisa:

Interface entre desempenho produtivo, reprodutivo, aspectos genéticos e ambientais na produção animal

Orientador:

Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno - Embrapa Sede

Comitê de Orientação:

Profª. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti – UFG

Profª. Dra. Raquel Soares Juliano – Embrapa Pantanal

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Bruna Paula Alves da

Estruturação genealógica para propostas de acasalamentos em rebanhos das raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro [manuscrito] / Bruna Paula Alves da Silva, José Robson Bezerra Sereno, Maria Clorinda Soares Fioravanti. - 2017.

xvi, 54 f.

Orientador: Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno; co-orientadora Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti; co-orientador Dr. Raquel Soares Juliano.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Animais em extinção. 2. Microssatélites. 3. Raça local. 4. Testes de paternidade. I. Sereno, José Robson Bezerra. II. Fioravanti, Maria Clorinda Soares. III. Sereno, José Robson Bezerra, orient. IV. Fioravanti, Maria Clorinda Soares, co-orient. V. Título.

CDU 635

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

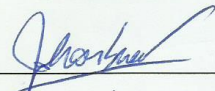
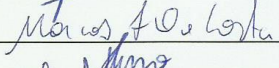
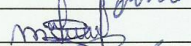


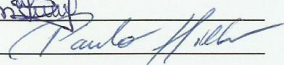
1 ATA NÚMERO 12 DA SESSÃO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DOUTORADO
2 DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA DA ESCOLA DE
3 VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, realizada
4 por **BRUNA PAULA ALVES DA SILVA**. Aos **29/03/2017** a partir das **14h00min**, na
5 sala de Reuniões do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária e
6 Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, nesta Capital, realizou-se a sessão
7 pública de Defesa de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a)
8 **BRUNA PAULA ALVES DA SILVA**, intitulada "**Estrutura genealógica para**
9 **proposta de acasalamentos em rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro e**
10 **Pantaneiro**", para obtenção do **Título de Doutor em Zootecnia**, junto à Área de
11 Concentração: **Produção Animal** desta Universidade. Os trabalhos foram instalados
12 pelo (a) Presidente da Comissão Julgadora, Orientador (a) **Prof. Dr. José Robson**
13 **Bezerra Sereno –Embrapa Cerrados**, com a participação dos demais membros da
14 Banca Examinadora **Dr. Marcos Fernando Oliveira e Costa – Embrapa Arroz e**
15 **Feijão; Prof. Dr. Diogo Alves da Costa Ferro – UEG/GO; Profa. Dra. Maria Ivete**
16 **de Moura – PUC/GO e Prof. Dr. Paulo Hellmeister Filho – EVZ/UFG**. Iniciando os
17 trabalhos, o Presidente concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **BRUNA PAULA**
18 **ALVES DA SILVA** para exposição em **cinquenta** minutos do seu trabalho. A seguir,
19 o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem, aos demais membros da
20 banca, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de
21 **trinta minutos**, assegurando-se ao mesmo, igual prazo para responder aos
22 Senhores Membros da Banca Examinadora. Ultimada a arguição, que se
23 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou
24 seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) Aprovado
25 **(Aprovado/Reprovado)** pelos seus membros. Proclamados os resultados da Banca
26 Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar lavrou-se a presente
27 ata que, após lida e achada conforme vai assinada pelos membros da Banca
28 Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno –Embrapa Cerrados
(Orientador(a))
Dr. Marcos Fernando Oliveira e Costa – Embrapa Arroz e
Feijão
Prof. Dr. Diogo Alves da Costa Ferro – UEG/GO
Profa. Dra. Maria Ivete de Moura – PUC/GO
Prof. Dr. Paulo Hellmeister Filho – EVZ/UFG

ASSINATURA



A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

Colocar o título no plural

A Deus e a minha família
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, discernimento, força e por estar ao meu lado todos os dias e em todos os momentos me abençoando.

A Universidade Federal de Goiás, por meio da Escola de Veterinária e Zootecnia, especificamente ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia que proporcionaram a obtenção deste título.

Ao meu orientador professor Dr. José Robson Bezerra Sereno pela sua importância durante a realização deste sonho, pela amizade, ensinamentos, apoio, dedicação e tamanha colaboração.

A minha co-orientadora professora Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti por toda sua colaboração, aprendizado proporcionado e apoio prestado em todos os momentos.

Aos professores Dr. Emmanuel Arnhold, Dra. Eliane Sayuri Miyagi e a minha co-orientadora Dra. Raquel Soares Juliano pela colaboração, atenção e paciência.

Ao pesquisador da Universidade de Córdoba, Espanha, Dr. Vincenzo Landi, pelo auxílio durante a análise de dados e interpretação dos resultados.

A todos os integrantes da Rede Pró-Centro-Oeste Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro, em especial à Dra. Maria Ivete de Moura e Dr. Marlos Castanheira pela colaboração.

A professora Dra. Adriana Santana do Carmo pela contribuição com este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia por todos os esforços para transmissão de conhecimento.

Aos meus pais, que amo tanto, Ângelo Gabriel da Silva e Eliane Alves da Silva pelo incentivo, colaboração, apoio, paciência e por serem meu porto seguro.

Ao meu irmão Osvaldo Gabriel Alves da Silva, minha cunhada Katiane Ferreira da Silva, por terem dado o melhor presente que já ganhei, a Gabi, Gabriela Alves Ferreira, minha sobrinha querida.

Ao meu namorado Arcênio Fernandes de Souza pelo apoio em todos os momentos, incentivo, compreensão e amor.

Aos meus avós Osvaldo Lemes da Silva, Eni Rodrigues da Silva (*in memorian*) e Geralda Alves Ferreira, pelo incentivo e apoio.

Aos meus tios e tias, especialmente Eva de Fátima da Silva, sempre tão atenciosa, dedicada e preocupada com todos os meus passos, meu muito obrigada.

Aos meus primos, primas e afilhados, por todo incentivo.

Aos meus amigos, professor Dr. Diogo Alves da Costa Ferro e professor Dr. Rafael Alves da Costa Ferro, pelo companheirismo, colaboração na coleta de dados, incentivo e principalmente pela amizade.

Aos professores da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Dra. Raquel Priscila de Castro Oliveira, Dra. Aracele Pinheiro Pales dos Santos e Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos, pelo incentivo e amizade.

Aos professores da Faculdade Montes Belos (FMB), MSc. Antônio Florentino de Lima Júnior, Esp. Luana Marriê de Moraes Souza e Esp. Vinicius Silva Vilela, pelo incentivo e amizade.

Aos meus alunos, monitores e estagiários da UEG e FMB, em especial, Tarcísio Ferreira, Rogério Rodrigues, Anderson Candido, Hipólito Rosa, Pedro Henrique Souza Ramos e Alberto Carlos Mineres Júnior, por todo apoio.

“Podemos julgar o coração de um homem pela
forma como ele trata os animais”.

Immanuel Kant

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1.	Introdução.....	1
2.	Revisão de literatura.....	3
2.1.	Histórico e estudo da raça Curraleiro Pé-Duro.....	3
2.2.	Histórico e estudo do bovino Pantaneiro.....	4
2.3.	Conservação de recursos genéticos animais.....	5
2.4.	Diversidade genética.....	6
2.5.	Caracterização genética.....	6
2.6.	Genealogia animal.....	7
2.6.1.	Marcadores microssatélites.....	8
2.6.1.1.	Reação em cadeia da polimerase.....	9
2.6.1.2.	Eletroforese.....	10
2.6.1.3.	Sequenciamento automático de DNA.....	10
2.6.2.	Endogamia.....	11
2.6.3.	Frequência alélica.....	12
2.6.4.	Heterozigosidade esperada e observada.....	12
2.6.5.	Conteúdo de informação polimórfica.....	13
2.6.6.	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	13
2.6.7.	Probabilidade de exclusão.....	14
2.6.7.1.	Testes de paternidade.....	14
2.7.	Programas de acasalamentos.....	14
3.	Contextualização da linha de pesquisa.....	15
	Referências.....	16
CAPÍTULO 2	ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE BOVINOS CURRALEIRO PÉ-DURO UTILIZANDO-SE MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	24
	Resumo.....	24
	Summary.....	25
	Introdução.....	25
	Material e métodos.....	26
	Resultados.....	27

	Discussão.....	29
	Conclusão.....	31
	Agradecimentos.....	31
	Bibliografia.....	31
CAPÍTULO 3	DIVERSIDADE GENÉTICA DE BOVINOS PANTANEIRO.....	39
	Resumo.....	39
	Summary.....	40
	Introdução.....	40
	Material e métodos.....	41
	Resultados.....	42
	Discussão.....	43
	Conclusão.....	46
	Agradecimentos.....	46
	Bibliografia.....	46
CAPÍTULO 4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela I	Identificação dos criatórios, número de amostras de DNA para os testes de paternidade, sexo dos animais (Fêmea/Macho-bezerros), número de touros supostos pais, código do grupo e total de animais da raça Curraleiro Pé-Duro.....	34
Tabela II	Microsatélites analisados (STR), cromossomos (crom.), tamanhos em pares de bases (pb), sequências de <i>primers</i> diretos e reversos e referências bibliográficas.....	35
Tabela III	Microsatélites analisados, número de alelos por marcador (NA), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) e valor de equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-valor).	36
Tabela IV	Resultados, em porcentagem, de controles de filiação de dezenove rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro do Brasil.....	37
Tabela V	Proporção de lotes de animais para acasalamentos em dezenove rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro por quatro anos, código do rebanho (CR), número de lotes de fêmeas (LF), número médio de fêmeas/lote (NF/L), número de touros utilizados (NT), número de touros/machos descartados (TD), tempo de utilização do reprodutor no lote em anos (TUR), rodízio de touros em anos (RT), número de reprodutores adquiridos (NRA).....	38

CAPÍTULO 3

Tabela I	Identificação dos criatórios, número de amostras de DNA para os testes de paternidade, sexo dos animais (Fêmea/Macho-bezerros), número de touros supostos pais, código do grupo e total de animais da raça Pantaneiro.....	49
Tabela II	Microsatélites analisados (STR), cromossomos (crom.), tamanhos em pares de bases (pb), sequências de <i>primers</i> diretos e reversos e referências bibliográficas.....	50
Tabela III	Microsatélites analisados, número de alelos por marcador (NA), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho),	

	conteúdo de informação polimórfica (PIC), coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) e valor de equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-valor).	51
Tabela IV	Resultados, em porcentagem, de controles de filiação de quatro rebanhos da raça Pantaneiro do Brasil.....	52
Tabela V	Proporção de lotes de animais para acasalamentos em quatro rebanhos da raça Pantaneiro por quatro anos, código do rebanho (CR), número de lotes de fêmeas (LF), número médio de fêmeas/lote (NF/L), número de touros utilizados (NT), número de touros/machos descartados (TD), tempo de utilização do reprodutor no lote em anos (TUR), rodízio de touros em anos (RT), número de reprodutores adquiridos (NRA).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	-	Desoxinucleotídeos
EHW	-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAO	-	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
F_{IS}	-	Coeficiente de consanguinidade
He	-	Heterozigosidade esperada
Ho	-	Heterozigosidade observada
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PE	-	Probabilidade de exclusão por marcador
PEC	-	Probabilidade de exclusão combinada
PIC	-	Conteúdo de informação polimórfica

RESUMO

As raças bovinas locais brasileiras Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro, habitantes do Cerrado, Semi-árido e Pantanal encontram-se em processo de extinção, correndo o risco de desaparecerem antes que suas características sejam adequadamente estudadas. Objetivou-se realizar a estruturação genealógica de rebanhos das raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro, com vistas à conservação de recursos genéticos animais, visando manter a variabilidade genética dentro das raças, evitando-se a endogamia, por meio de propostas de acasalamentos baseadas na genealogia. Foram analisadas amostras de pelos de 1073 bovinos Curraleiro Pé-Duro de dezenove rebanhos e 290 Pantaneiros de quatro rebanhos. Realizou-se a amplificação de 27 microssatélites de DNA por PCR. Foi calculado o número médio de alelos por loco, frequência alélica, heterozigosidade esperada e observada e conteúdo de informação polimórfica. Para cada animal foi emitido parecer do controle de filiação. Observou-se grande variabilidade alélica para as raças, onde o Curraleiro Pé-Duro apresentou média de 8,70 alelos por loco e o Pantaneiro 6,70. Os valores médios de heterozigosidade esperada e observada foram 0,713 e 0,653, respectivamente, para o Curraleiro Pé-Duro e 0,701 e 0,672, para o Pantaneiro. O valor médio de conteúdo de informação polimórfica para o Curraleiro Pé-Duro foi 0,671 e para o Pantaneiro 0,655. A probabilidade de exclusão combinada para as raças foi 0,99992. Os lotes de acasalamentos foram montados na proporção macho:fêmea mínima de 1:13 à máxima de 1:26 para o Curraleiro Pé-Duro e de 1:13 à 1:21 para o Pantaneiro, dependendo do tamanho do rebanho. Os testes de paternidade possibilitaram a elaboração de programas reprodutivos para os rebanhos, com vistas a melhorar a gestão genética destas populações, evitando-se a endogamia. Ambas as raças apresentaram grande variabilidade genética intra-racial, demonstrando que apesar de estarem em extinção possuem rebanhos com muita diversidade genética.

Palavras-chave: Animais em extinção, microssatélites, raça local, testes de paternidade.

ABSTRACT

The Brazilian bovine breeds Curraleiro Pé-Duro and Pantaneiro, inhabitants of Cerrado, Semi-árido and Pantanal are in the process of extinction, at risk of disappearing before their characteristics are adequately studied. The objective was to perform the genealogical structure of breeds Curraleiro Pé-Duro and Pantaneiro, with a view to the conservation of animal genetic resources, in order to maintain the genetic variability within breeds, avoiding inbreeding, through proposals from matings based on genealogy. Samples of hair bulb from 1073 Curraleiro Pé-Duro cattle from nineteen herds and 290 Pantaneiros from four herds were analyzed. Amplification of 27 DNA microsatellites was performed by PCR. The average number of alleles per locus, allele frequency, heterozygosity expected and observed and polymorphic information content were calculated. For each animal an opinion of the affiliation control was issued. Large allelic variability was observed for the breeds, where the Curraleiro Pé-Duro presented an average of 8,70 alleles per locus and the Pantaneiro 6,70. The values of expected and observed heterozygosity were 0,713 and 0,653, respectively, for the Curraleiro Pé-Duro and 0,701 and 0,672 for Pantaneiro. The average value of polymorphic information content for the Curraleiro Pé-Duro was 0,671 and for the Pantaneiro 0,655. The probability of combined exclusion for the breeds was 0,99992. The mating lots were set at the minimum male:female ratio of 1:13 to the maximum of 1:26 for the Curraleiro Pé-Duro and 1:13 to 1:21 for the Pantaneiro, depending on the size of the herd. The paternity tests enabled the elaboration of reproductive programs for the herds, aiming to improve the genetic management of these populations, avoiding inbreeding. Both breeds showed great genetic variability inside of breeds, demonstrating that although they are in extinction have herds with a lot of genetic diversity.

Keywords: Endangered animals, local breed, microsatellites, paternity tests.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução

A baixa produtividade da maioria das raças locais brasileiras tem causado a extinção destas, sem ao menos ter sido conhecido seu potencial genético e sua importância para o país. O manejo reprodutivo utilizado se mostra inadequado, com acasalamentos não direcionados, desordenados e ainda com a relação macho:fêmea desproporcional. Estão sendo realizados cruzamentos com outras raças na tentativa de resolver problemas como o desempenho animal, o que, por sua vez, está acarretando o desaparecimento destes animais e, conseqüentemente de raças que poderiam ser mais bem utilizadas em determinados ecossistemas¹.

Existem várias ameaças à diversidade genética, sendo a marginalização dos sistemas tradicionais de produção e as raças locais a eles associados a principal delas. A rápida expansão da produção pecuária intensiva e em grande escala, utilizando-se um pequeno número de raças tem contribuído para essa problemática. A intensificação da produção e a industrialização auxiliaram no aumento do rendimento da produção animal para alimentar a crescente população humana. Entretanto, é necessário traçar políticas para minimizar a perda da diversidade dos recursos genéticos animais².

Para facilitar a análise da situação mundial dos recursos genéticos animais, a FAO desenvolveu um novo sistema de classificação de raças, sendo estas classificadas como locais, que ocorrem em apenas um país ou transfronteiriças, que ocorrem em mais de um país. Dentro da categoria transfronteiriças tem-se uma subdivisão em regionais, aquelas que ocorrem em mais de um país dentro de uma única região ou continente e as internacionais, as que ocorrem em mais de uma região ou continente².

Diversas raças bovinas locais brasileiras são originárias de animais trazidos pelos colonizadores portugueses e foram submetidas à seleção natural e artificial ao longo dos anos, nos mais diversos ambientes, desenvolvendo características específicas como rusticidade e resistência a endo e ectoparasitas, que permitiram a adaptação a distintas condições e ecossistemas. No início do século XX, inúmeras raças exóticas foram importadas para o Brasil, em sua maioria selecionadas em regiões de clima temperado, com desempenho produtivo e reprodutivo comprovado em razão do melhoramento genético, ocasionando drástica substituição das raças locais³.

Dentre os bovinos locais brasileiros destacam-se as raças Pantaneiro e Curraleiro Pé-Duro. O bovino Pantaneiro encontra-se restrito à região do Pantanal e o Curraleiro Pé-Duro principalmente na região do Cerrado e Semiárido.

A raça Curraleiro Pé-Duro, ameaçada de extinção é considerada rústica, possui baixo custo de produção, carne saborosa e com baixo teor de gordura, estando os animais distribuídos no Piauí, Tocantins, Goiás e Pará, sendo estimado que existam aproximadamente 5.000 animais dessa raça⁴.

O bovino Pantaneiro passou por mudanças morfológicas, comportamentais e fisiológicas ao longo dos anos, que os tornaram mais resistentes e muito adaptados às condições do Pantanal. Essas mudanças não ocorreram apenas em virtude da seleção natural, mas também em razão dos cruzamentos desses animais com outras raças, ocasionando uma perda da diversidade genética do Pantaneiro⁵.

O conhecimento da estrutura genética de raças, espécies e populações é importante para a caracterização racial e consequentemente para preservação de animais em risco de extinção. O estudo genético utilizando marcadores microssatélites possibilita definir a diversidade genética entre animais e raças, proporcionando maior eficiência dos programas de acasalamentos, por meio do estudo da genealogia, otimizando o sistema de criação destes e auxiliando os criadores na escolha de métodos mais adequados ao sistema de produção em que estes animais estão inseridos.

Na implantação de programas de conservação é necessário a utilização de técnicas que auxiliem a análise de parentesco e a identificação genética de indivíduos para direcionar os acasalamentos visando a manutenção da diversidade genética⁶.

Os marcadores moleculares têm sido bastante utilizados para identificar genes de interesse econômico, mapeamento genético, estudos evolucionários, identificação de paternidade, introgressão de genes úteis, diagnóstico precoce de doenças, caracterização assistida por marcadores e caracterização genética de populações locais⁷.

Os marcadores microssatélites são neutros e altamente polimórficos, sendo utilizados para estimar as distâncias genéticas, estruturar populações, identificar raças, realizar testes de paternidade e estudos de caracterização genética, que possibilitam o estabelecimento das relações filogenéticas entre diversas raças^{8,9}.

As estratégias de conservação animal têm se baseado na caracterização das raças e também de populações para verificar a diversidade genética. Durante muito tempo a caracterização dos recursos genéticos animais baseou-se em características morfológicas e produtivas, sendo estas insuficientes para distinguir raças, além de serem influenciadas pelo

ambiente. As estratégias de conservação necessariamente devem ser embasadas na combinação de dados fenotípicos e genotípicos¹⁰.

São escassos os trabalhos de caracterização produtiva das raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro. Sendo que tais índices ou taxas (peso ao nascer, peso a desmama, idade e peso à puberdade, idade e peso ao primeiro parto, intervalo entre partos, vida útil reprodutiva e outros) são necessários para a expansão e multiplicação deste patrimônio genético, respondendo a demanda de criadores e sociedade de forma geral. Entretanto, para estabelecimento destes índices zootécnicos faz-se necessário o controle genealógico e a formação das diferentes famílias existentes em diferentes rebanhos para maior controle e rigor da criação. Neste sentido, foi determinada a paternidade dos animais por meio de microsatélites de DNA, com o intuito de estruturar os rebanhos em famílias, propondo programas de acasalamentos para os rebanhos, de forma que se evite a endogamia e mantenha a variabilidade genética dentro das raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro.

Dessa forma, objetivou-se realizar a estruturação genealógica de rebanhos das raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro, com vistas à conservação de recursos genéticos animais, visando manter a variabilidade genética dentro das raças, evitando-se a endogamia, por meio de propostas de acasalamentos baseadas na genealogia.

2. Revisão de literatura

2.1. Histórico e estudo da raça Curraleiro Pé-Duro

A origem do Curraleiro Pé-Duro no Brasil se explica pela entrada de raças ancestrais no país por volta de 1534, inicialmente na antiga São Vicente onde hoje se localiza o estado de São Paulo, posteriormente, as capitanias de Pernambuco e Bahia de Todos os Santos também receberam esses animais. Acredita-se que a raça teve origem no tronco *Bos taurus ibericus*, ao qual também pertenciam as raças Alentejana, Galega e Mirandesa¹¹.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), por meio da Embrapa Meio-Norte, passou a manter a partir de 1983 um núcleo de preservação de bovinos Curraleiro Pé-Duro no município de São João do Piauí, estado do Piauí, onde os animais eram criados em pastos nativos. Em 2007, a Universidade Federal de Goiás (UFG), com financiamento do Ministério da Integração Nacional, estabeleceu o Núcleo de Criação de Curraleiro Pé-Duro no Sítio Histórico e Patrimônio Cultural Kalunga, com o objetivo de

reintroduzir esta raça na comunidade Kalunga de Cavalcante, estado de Goiás, para atender demanda dos próprios moradores da comunidade, projeto que contou com o apoio da Prefeitura Municipal de Cavalcante e da Associação Kalunga de Cavalcante. A partir deste projeto, foram implantados outros núcleos de criação de bovinos locais com o objetivo de estudar, preservar e utilizar os animais e raças⁴.

A raça Curraleiro Pé-Duro foi reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da portaria nº 1.150, de 14 de dezembro de 2012. Esta portaria concedeu a Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Curraleiro Pé-Duro, que tem sua sede em Teresina, Piauí, a autorização para efetuar o registro genealógico de animais da raça, sob o número de registro no MAPA 69/BR, sendo acompanhado e fiscalizado pelo Departamento de Sistemas de Produção e Sustentabilidade, da Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo¹².

2.2. Histórico do bovino Pantaneiro

Crioulos, nome dado ao rebanho nacional originário dos primeiros animais que adentraram o Brasil, é também uma designação baseada em informações históricas, que considera que as raças Curraleiro e Pantaneiro teriam se originado do gado ibérico, de Portugal e Espanha, como as raças Mirandesa e Brava¹³.

O Pantanal mato-grossense, região de topografia plana, condições climáticas variadas, altas temperaturas no período do verão e ainda alternância entre períodos de seca e com alagamentos frequentes durante grande parte do ano, originou algumas raças localmente adaptadas. Durante muitos anos os animais foram criados livres nessa região, com pastagens naturais e abundantes, que possibilitaram a sobrevivência e a adaptação, contribuindo para as atuais características do bovino Pantaneiro. Essa raça é a precursora da atividade pecuária no Pantanal, iniciada efetivamente na província de Mato Grosso a partir da década de 1830, com registros mais detalhados da sua importância sócio econômica presentes a partir de 1873¹⁴.

Os núcleos de conservação de bovinos Pantaneiros até 2009 estavam restritos a Fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal, em Corumbá (MS), Fazenda Promissão, em Poconé (MT), além da presença de animais em estado assilvestrado nos campos da Fazenda Jofre em Poconé (MT). Posteriormente foram criados o Núcleo NUBOPAN do Campus de Aquidauana da UEMS e Fazenda Santo Augusto, em Rochedo (MS). Algumas unidades da Embrapa, Universidades e parceiros se propuseram a estudar características genéticas, produtivas, reprodutivas e sanitárias destes animais¹⁵.

Com a aprovação da rede de pesquisa “Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro” foi possível contemplar, a partir de 2012, demandas de interesse para fomento dessas raças em projetos de pesquisa e desenvolvimento conjuntos. Em 2013 foi criada a Associação Brasileira de Criadores de Bovino Pantaneiro (ABCBP), novos criatórios foram identificados e há expectativas que os criadores trabalhem junto ao MAPA para o reconhecimento da raça.

2.3. Conservação de recursos genéticos animais

O histórico fluxo de genes e os padrões atuais da distribuição dos animais demonstra uma interdependência entre os países e as regiões do mundo. É preciso que haja um uso sustentável destes recursos genéticos para que produtores rurais, pecuaristas, melhoristas e pesquisadores tenham amplo acesso a esses recursos. A integração da gestão dos recursos genéticos ajudarão a garantir que a riqueza da biodiversidade animal seja usada e desenvolvida de maneira apropriada para a alimentação e a agricultura, de forma que seja disponibilizada para as futuras gerações².

Um número indefinido de raças e variedades animais está desaparecendo, sendo absorvido ou trocado por outras raças, consideradas de maior produção. Os recursos genéticos de um país constituem um patrimônio biológico e cultural único e devem ser identificados os valores de cada raça por meio da seleção intra-rebanho¹⁶.

Alguns centros de pesquisa estão adotando programas de conservação de recursos genéticos, essa adoção possui intuito de minimizar as perdas desses recursos e consequentemente assegurar uma boa produção de alimentos para as populações futuras. A produção de alimentos pode passar por algumas complicações influenciadas pelas alterações relacionadas ao clima e crises financeiras, por isso a criação de algumas raças locais pode ser uma alternativa para solucionar essa instabilidade e gerar renda¹⁷.

A sobrevivência da humanidade depende de questões relacionadas à conservação dos recursos genéticos, ou seja, esse fator é indiscutível quando se pensa em continuidade da vida das populações, tornando-se responsabilidade das autoridades governamentais. Sendo assim, a produção de alimentos hoje depende muito dessa diversidade genética, portanto, são necessárias estratégias que visam solucionar problemas como crescimento populacional, mudanças climáticas, surgimento de pragas e doenças¹⁸.

Existem dois tipos básicos de conservação das espécies, a conservação realizada *in situ* e a outra *ex situ*, a primeira se refere ao processo de conservação que é desenvolvido no

próprio habitat das espécies onde elas se desenvolvem e o segundo tipo trata-se da conservação realizada nos bancos de germoplasma¹⁸.

2.4. Diversidade genética

A diversidade genética é um fator de extrema importância, pois é por meio dela que os processos de seleção naturais ou artificiais mostram respostas imediatas, independente da ocasião, seja ela no presente ou no futuro. A diversidade das espécies domésticas reflete-se na quantidade de raças existentes e na variação dentro de cada raça. O método mais utilizado para realizar a quantificação da diversidade genética é a análise de genótipos de indivíduos que não sejam aparentados entre si, que sejam por sua vez, selecionados da população investigada¹⁹.

Os determinantes da diversidade gênica de uma espécie são: a heterozigosidade, que representa a variação genética dentro do indivíduo; as diferenças genéticas entre indivíduos dentro de uma população e as diferenças genéticas entre populações²⁰.

2.5. Caracterização genética

A caracterização genética de populações proporciona o estudo da variabilidade genética. A variabilidade genética total de uma espécie resulta do conjunto representado pela contribuição da variabilidade intra e inter-populacional. Estes parâmetros são importantes para a conservação dos recursos genéticos, evitando a extinção de animais ameaçados²¹.

Portanto, uma estratégia que têm ganhado espaço e sendo cada vez mais utilizada para caracterização genética é o uso de marcadores moleculares, uma vez que essa é muito eficiente para determinação da diversidade genética de animais domésticos²².

As análises de polimorfismos de microssatélites tem sido muito utilizadas em estudos de variabilidade genética para verificar a variação genética intra e inter-populacionais e para determinar a distância ou similaridade genética entre populações¹⁹.

Para este estudo tem-se utilizado frequências alélicas, coeficiente de consanguinidade (F_{IS}), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), conteúdo de informação polimórfica (PIC), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), probabilidade de exclusão (PE)²³.

2.6. Genealogia animal

Os recursos genéticos das raças bovinas Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro são pouco conhecidos, porém, possuem importância econômica e social. Além disso, os registros genealógicos escassos podem causar grandes dificuldades para contemplar o recurso genético local e beneficiar algumas alternativas para aperfeiçoar a utilização e consumo dos produtos desses animais. Isso pode tornar o recurso genético mais suscetível a introgressão, deriva e erosão genética. Reduções significativas da diversidade genética, como diminuição de variabilidade alélica, devem ser evitadas quando se realiza um bom planejamento e gestão. O registro de uma raça local no Brasil aumenta sua visibilidade e disponibilidade de informações sobre o material genético, podendo alcançar importância no âmbito nacional²⁴.

As raças nacionais são apontadas como raças de baixa produção, quando comparadas às demais raças advindas do exterior, que por sua vez são especializadas. Porém, esse grupo de animais possuem características importantes que são relevantes quando se trata de adaptações ao clima, que podem ser bem interessantes para programas de melhoramento genético. Sendo assim, uma avaliação molecular pode ser realizada, mas para isso é importante que cada indivíduo que será utilizado seja caracterizado quanto a morfologia e morfometria²⁵.

O arquivo de genealogia das raças permite traçar o número médio de ancestrais por indivíduo e o número de gerações. O número efetivo de fundadores avalia como o balanço esperado das contribuições dos fundadores é mantido entre as gerações, considerando a taxa de seleção e a variação de tamanho de família. Uma das causas de perda ou fixação de alelos nas populações é a diminuição do número de reprodutores em determinado período, que é considerado quando se estima o número efetivo de ancestrais, enquanto o número efetivo de genomas remanescentes avalia o número de alelos fundadores que são mantidos na população para determinado loco e as possibilidades de perdas de alelos fundadores²⁶.

O uso de poucos animais como reprodutores e a utilização destes de forma intensa contribuiu para justificar a pouca representação de animais fundadores no pedigree dos rebanhos ao longo das gerações¹⁶.

O interesse crescente pelos efeitos da dominância apoia-se na intensa utilização do sêmen de poucos reprodutores, considerados de superioridade genética comprovada e na utilização de biotecnologias reprodutivas modernas como superovulação, fertilização *in vitro*, transferência de embriões e clonagem. Dessa forma, aumentou-se o número de progênie de irmãos completos e o parentesco nas populações²⁷.

2.6.1. Marcadores microssatélites

Existem marcadores genéticos cuja função é marcar alelos nos quais a identificação é difícil. Sendo assim, essa técnica permite a seleção de um alelo de interesse de forma indireta por meio do marcador. Essa ferramenta pode complementar estudos de divergência genética que objetivam pesquisas evolutivas, testes de paternidade e identificação de genótipos²⁸.

É designado marcador molecular toda característica contida no DNA que é herdável e capaz de diferenciar dois ou mais indivíduos. Esses marcadores identificam alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA que são conhecidas como polimorfismos²⁹.

A análise do DNA de animais de produção tem como finalidade detalhar a arquitetura genética de características com valor econômico agregado, definindo a quantidade de genes e quanto cada um desses genes contribui para expressão fenotípica. Essa estratégia não é tão simples, pois as características de interesse econômico são de aspecto quantitativo, sendo influenciadas por inúmeros genes, onde cada um colabora com uma parte para determinar o fenótipo do animal³⁰.

Os marcadores podem ser classificados de acordo com a metodologia para identificá-los, sendo elas a hibridização ou amplificação de DNA. Os marcadores moleculares RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e os locus VNTR (*variable number of tandem repeats*) ou minissatélites são identificados por hibridização, enquanto os marcadores do tipo RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), SCAR (*sequence characterized amplified regions*), STS (*sequence tagged sites*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e microssatélites são identificados por amplificação e foram desenvolvidos após a descoberta da PCR, que por sua vez, permitiu a amplificação de DNA *in vitro*³¹.

Vários tipos de marcadores moleculares detectam o polimorfismo genético diretamente do DNA, entre estes se destacam a classe conhecida como microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*), ou ainda STR (*short tandem repeats*), por serem bastante polimórficos, ou seja, possuem grande habilidade para detectar diferenças entre indivíduos³².

A utilização de marcadores moleculares vem cada vez mais tomando espaço nas pesquisas envolvendo animais, principalmente quando se trata de importantes segmentos como o melhoramento genético das espécies, além da colaboração que essa técnica tem trazido para a conservação de várias espécies animais³³.

As maiores aplicações dos marcadores de DNA têm sido a sexagem de embriões, testes de paternidade e utilização com vistas a detectar doenças genéticas ou características funcionais em determinadas raças³⁴. Os microssatélites são muito utilizados na investigação da estrutura populacional de diversas espécies de animais domésticos, considerando os métodos de agrupamento, os quais possibilitam a inferência de estrutura de populações e a designação de indivíduos a populações^{35, 36}.

Os microssatélites envolvem sequências de DNA de forma repetitiva, englobando todos os organismos eucariontes e procariontes. Eles são formados por repetições na maioria dos casos com sequências que variam de dois a seis nucleotídeos, tomando uma extensão de até 100 pares de bases. Nos animais as frequências que mais se repetem de forma comum é a $(AC)_n$, sendo sequências espalhadas por todo o genoma. Nos microssatélites, as sequências se encontram tanto nos pontos onde há codificação quanto onde não há, portanto, nas sequências transcritas as frequências são maiores²⁸.

Os microssatélites podem ser agrupados de forma simples com várias repetições, exatamente iguais, na maioria dos casos de dois até seis nucleotídeos $(N_1, N_2... N_6)_n$. Eles também podem se apresentar na forma imperfeita, uma vez que os mesmos possuem unidades diferentes ocorrendo juntas e de forma repetida $(CA)_n (GT)_n$. Outra forma de ocorrência acontece em regiões espaçadoras entre unidades que se repetem $(CA)_n (N)_n (GT)_n$. Os fragmentos que são flanqueados por sequências conservadas serão destinados a marcadores. Dessa forma, *primers* complementares são formados pelo sequenciamento dos flancos amplificados por uma reação de PCR²⁸.

2.6.1.1. Reação em cadeia da polimerase

Na biologia molecular, uma ferramenta muito utilizada e de extrema importância é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica foi elaborada em 1985 pelo pesquisador Kary Mullis e seus colaboradores e vem sendo utilizada com mais frequência na determinação e identificação de genes de interesse de animais domésticos. E cada vez mais, esta técnica está ganhando espaço, sendo utilizada em programas de melhoramento genético animal e práticas veterinárias³⁷.

Para execução da PCR o DNA a ser utilizado pode ser genômico, ou seja, extraído de leucócitos ou uma amostra de DNA de uma fonte qualquer. Essa técnica gera cerca de um milhão de réplicas de um minúsculo segmento de DNA molde, isso possibilita a clonagem, análise ou sequenciamento do mesmo, porém é necessário que se tenha conhecimento da

sequência desse segmento que será ampliado. A partir daí, dois segmentos de nucleotídeos denominados de oligonucleotídeos são produzidos de forma artificial, cada um possui em torno de 20 bases de comprimento. Os oligonucleotídeos também são chamados de “iniciadores” (*primers*), isso se deve ao fato da função que eles possuem que é a de iniciar a produção de novas fitas de DNA¹⁶.

A PCR tem como objetivo principal amplificar regiões específicas de DNA, com o intuito que se tenha um grande número de cópias, considerando que apenas uma cópia de uma sequência não é suficiente para ser analisada³⁸.

2.6.1.2. Eletroforese

A eletroforese compreende uma técnica de genotipagem que possibilita separar moléculas em função da sua massa, forma e compactação. Esta técnica é sensível, rápida e precisa. A molécula, o DNA, migra nos suportes, que podem ser géis de agarose ou acrilamida, em razão da ação de uma corrente elétrica, com diferentes velocidades que dependem de seu tamanho e forma. As moléculas de DNA migram para o polo positivo quando submetidas a um campo elétrico, porque são carregadas negativamente e o atrito com o gel suporte, reage como força oposta à migração. Dessa forma, quanto maior a molécula, maior o atrito e mais lenta a migração³⁹. Em alguma ocasião do processo de eletroforese, as moléculas de diferentes tamanhos se encontram em pontos distintos da matriz⁴⁰.

2.6.1.3. Sequenciamento automático de DNA

O sequenciamento automático de DNA consiste na aplicação de sequenciadores. Essa aplicação pode ocorrer de duas formas, uma se trata do uso de eletroforese vertical em placa (ABI377 Applied Biosystem) e a outra eletroforese em capilar (ABI3100 Applied Biosystem), nos quais os próprios desoxinucleotídeos (dNTPs) tem marcação com fluorescência, diferente do método manual que essa marcação é na forma radioativa. Para a produção de fragmentos durante a reação de sequenciamento, os dNTPs são acrescentados a fita recém-formada e no momento da inclusão de um ddNTP, a extensão da cadeia é interrompida e consequentemente marcada com o último didesoxinucleotídeo incorporado. No final de vários ciclos tem-se várias cadeias de DNA de diferentes tamanhos terminadas com diferentes ddNTPs que posteriormente serão identificados e a leitura é realizada em sequenciador automático⁴¹.

2.6.2. Endogamia

A endogamia é resultante do acasalamento, intencional ou não, de animais aparentados, sendo este sistema capaz de alterar a constituição genética da população pelo aumento da homozigose e diminuição da heterozigose, o que pode alterar a frequência genotípica⁴².

O coeficiente de endogamia ou consanguinidade (F_{IS}) representa o grau de endogamia de um indivíduo, sendo a probabilidade de que dois alelos em um loco tomado ao acaso sejam idênticos por descendência. O coeficiente de endogamia de um indivíduo pode ser calculado como a metade do parentesco entre seus pais. O parentesco, por sua vez, representa a porcentagem esperada de genes em comum entre indivíduos. Como exemplo, o parentesco entre meio irmãos (filhos de um mesmo progenitor) é de 25%, sendo que o acasalamento entre eles resultaria em um animal com coeficiente de endogamia de 12,5%⁴³.

O acasalamento de indivíduos com algum grau de parentesco pode resultar no surgimento de animais com maior número de genes homozigotos e consequentemente causar impacto negativo devido a diminuição drástica da variabilidade genética⁴⁴.

A principal causa da endogamia é a produção de seres geneticamente semelhantes por meio do aumento da homozigose. Sendo assim, quando em porcentagens altas, a endogamia pode ocasionar problemas reprodutivos e produtivos, devido o aumento da frequência de genes deletérios indesejáveis³⁷.

Existem duas formas utilizadas pelos produtores para alterar a estrutura genética das populações, uma é a seleção de animais que serão seus reprodutores e a outra é por meio do descarte. Mesmo podendo causar influências negativas como a redução no mérito fenotípico dos animais, o acasalamento entre animais com certo grau de parentesco é utilizado com frequência⁴⁵.

Problemas associados à endogamia podem ser minimizados pelo aumento da diversidade genética encontrada em uma determinada raça, uma vez que esta pode influenciar as adaptações genéticas relacionadas a mudanças no ambiente, economia e índices produtivos⁴⁶.

A elevação da endogamia pode ocasionar o surgimento de genótipos indesejáveis, pois há um grande número de alelos com efeitos deletérios, que em grande parte dos casos se apresentam na forma de homozigose recessiva. Influências negativas têm sido notadas em características de grande importância econômica como crescimento, sobrevivência e índices reprodutivos, que ocorrem devido a expressão de combinações gênicas indesejáveis. Sendo

assim, percebe-se o quanto esses fatores são importantes para proporcionar variabilidade na produção animal, além disso, a determinação da endogamia é indispensável⁴⁷.

A taxa de endogamia em rebanhos e populações com tamanhos reduzidos é mais elevada em relação a populações com maior número efetivo de indivíduos, uma vez que em pequenos grupos de indivíduos a ocorrência de acasalamentos entre parentes é mais frequente¹⁸.

2.6.3. Frequência alélica

Ao se definir a frequência alélica, os locos microssatélites altamente polimórficos podem ser úteis para identificar os indivíduos em uma população e determinar a probabilidade de parentesco dentre dois indivíduos⁴⁸.

O número médio de alelos é considerado uma medida útil para caracterizar a variabilidade genética. Na determinação do número de alelos conta-se o número de alelos detectados em cada loco, com posterior soma dos valores obtidos e divisão pelo total de locos estudado, obtendo assim a frequência alélica. Para esta determinação faz-se necessário conhecer o resultado da análise do conjunto de indivíduos de uma determinada população para o microssatélite⁴⁹.

2.6.4. Heterozigosidade esperada e observada

A heterozigosidade pode ser considerada uma medida de variabilidade genética¹⁹, sendo a heterozigosidade de um loco definida como a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto naquele loco⁴⁸.

O loco é considerado polimórfico quando o alelo mais comum apresenta uma frequência inferior a 95% e um marcador é considerado altamente informativo com heterozigosidade maior que 70%. A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no loco marcador, dependendo do número de alelos e da frequência destes alelos na população⁵⁰.

A heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), juntamente com o número médio de alelos são os parâmetros mais utilizados para verificar a diversidade genética dentro de uma raça, onde os índices de diversidade genética, como a heterozigosidade média de uma população pode ser utilizada para verificar o nível de endogamia do rebanho⁵¹.

Define-se H_e como uma fração estimada de todos os indivíduos que poderiam ser heterozigotos em um loco. Diferindo da H_o , por ser uma previsão baseada na frequência alélica, sendo que o desvio observado entre a H_e e H_o , pode ser um indicativo da dinâmica populacional⁵².

Considera-se H_o a proporção de indivíduos heterozigotos observados em uma população estudada²³.

2.6.5. Conteúdo de informação polimórfica

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) quantifica o valor da informação do polimorfismo de um loco marcador, sendo considerado um parâmetro dependente do número de alelos e de suas frequências. As classificações dos marcadores com valores de PIC são considerados muito informativo, mediantemente informativo e pouco informativo, com valores superiores a 0,5, entre 0,25 e 0,50 e, inferiores a 0,25, respectivamente⁵³.

2.6.6. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A lei de Hardy-Weinberg (EHW) pode ser deduzida pela observação das frequências em qualquer população de animais que transpõe uma geração de cruzamentos ao acaso. Quando isso acontece, as frequências genótípicas na prole são determinadas exclusivamente pelas frequências gênicas nos genitores e as frequências gênicas e genótípicas permanecem constantes de uma geração para a seguinte, sendo dito que está em EHW. Isso é observado em uma população de cruzamentos ao acaso, em que não há seleção, mutação, migração ou deriva genética⁵⁴.

A seleção, migração, mutação e deriva genética são os quatro fatores que podem interferir no EHW de uma população, interferindo então na variabilidade genética da população. A seleção atua de maneira negativa na variabilidade genética, promovendo a fixação de genes na mesma, com a utilização de poucos indivíduos para o acasalamento. A migração está relacionada com a entrada de novos genes em uma determinada população, contribuindo para a erosão genética da população local, com a utilização de cruzamentos absorventes. Mutação é uma variação brusca e hereditária, que pode ocorrer em algum gene. A deriva genética é uma alteração natural na frequência de alelos, ocorrendo em populações pela perpetuação de genes por meio da reprodução, ocasionando rápida redução da variabilidade genética e aumento de homozigosidade⁵⁵.

Os desvios de equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW) podem ocorrer em razão de fatores como acasalamentos direcionados, antepassados comuns, subdivisões dentro da população, seleção natural e artificial, fluxo de genes a partir de população externa ou migração²¹.

2.6.7. Probabilidade de exclusão

A probabilidade de exclusão (PE) pode ser definida como a probabilidade de um animal escolhido aleatoriamente não ser o pai ou a mãe de uma determinada cria. A probabilidade de exclusão combinada (PEC) é utilizada quando se trabalha com todos os locos²³.

2.6.7.1. Testes de paternidade

As informações de parentesco são à base das avaliações genéticas de populações e, portanto subordinadas a registros confiáveis de paternidade. Os testes de paternidade permitem uma melhora na acurácia dos parâmetros genéticos populacionais⁵⁶.

Os testes de paternidade são realizados por meio da comparação direta da fórmula genética do animal em estudo com as fórmulas dos pais propostos, onde o resultado pode ser positivo ou negativo para um deles ou ambos⁵⁷.

2.7. Programas de acasalamentos

Os programas de acasalamentos devem considerar as informações a respeito de pedigree, endogamia, defeitos genéticos e características a serem corrigidas. Devem-se definir os grupos de vacas ou novilhas que irão participar do programa e os touros, observando os objetivos da seleção realizada⁵⁸.

A utilização de programas de acasalamentos dirigidos possibilita melhor exploração dos animais superiores com relação ao potencial genético dos mesmos, no qual se busca obter respostas à finalidade anteriormente proposta⁵⁹.

O acasalamento exogâmico deve ser utilizado quando se deseja elevar a variabilidade genética do rebanho e evitar os efeitos da consanguinidade, sendo necessário conhecer a distância genética dos animais para a orientação individual dos acasalamentos⁶⁰.

Um dos tipos de acasalamento existentes é o acasalamento genético otimizado, que se inicia a partir do momento da escolha do reprodutor, que ocorre por meio de informações sobre a genética do animal, uma vez que, ao ser acasalado com alguma fêmea pode aumentar o valor genético da prole³¹.

Os programas de acasalamentos podem ser desenvolvidos durante o ano todo ou, em alguns casos, podem ser estabelecidos durante algum período, como por exemplo, uma estação de monta, prática muito utilizada na bovinocultura, que direciona os nascimentos para o início da seca, pois nessa época do ano ocorre a suplementação dos animais e os preços pagos ao produtor são bem consideráveis⁶¹.

3. Contextualização da linha de pesquisa

Para estabelecer programas de conservação animal é necessário a obtenção de dados da genealogia dos animais e das raças, possibilitando a identificação, o controle da endogamia, o aumento da variabilidade genética, a elaboração de planejamentos de acasalamentos e a inclusão destes animais em programas de melhoramento genético, a partir do estabelecimento do padrão racial e do registro genealógico de raças que ainda não o possuem, com vistas a aumentar a capacidade produtiva e reprodutiva destes animais, maximizando a sua criação e utilização.

Neste contexto torna-se necessária a realização de estudos de caracterização genética e racial, envolvendo matriz de parentesco e diversidade genética, possibilitando o uso destes animais em programas de multiplicação de germoplasma, seleção e melhoramento genético, proporcionando alternativas de produção animal para o meio rural.

A Rede Pró-Centro-Oeste “Caracterização, conservação e uso das raças bovinas locais brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro”, tendo este trabalho como um dos inúmeros executados em prol destes recursos genéticos está cumprindo seu papel com o monitoramento de rebanhos, conscientização de produtores e sociedade em geral, além da caracterização e avaliação destas populações.

Ao trabalhar com estas raças percebeu-se seu valor social para o país, sendo animais criados em locais que outras raças não têm o mesmo desempenho, sobrevivendo em regiões com escassez de alimentos, necessitando de pouco manejo e ainda servindo como fonte de alimento para populações de variadas regiões. São raças que precisam ser mais bem exploradas e que não passaram por melhoramento, não podendo ser comparadas em termos de

produção com outras exóticas, mas que possuem características únicas, como adaptação e rusticidade, merecendo ser estudadas.

Referências

- 1- Silva BPA, Juliano RS, Arnhold E, Fioravanti MCS, Ferro DAC, Ferro RAC, Sereno JRB. Avaliação fenotípica qualitativa como critério para implantação de programas de acasalamentos em rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro. *Actas Iberoamer. Conser. Ani.* 2016;7:64-73.
- 2 - FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Situação mundial dos recursos genéticos animais para agricultura e alimentação – versão resumida. Campos SM, Mariante AS, tradutores. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2010. 42p.
- 3- Egito AA, Mariante AS, Albuquerque MSM. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arch. Zootec.* 2002;51:39-52.
- 4- Fioravanti MCS, Sereno JRB, Neiva ACGR, Abud LJ, Lobo JR, Francescantônio D, Cardoso WS, Silva FX, Machado JRL. Reintrodução do gado Curraleiro na comunidade Kilombola Kalunga de Cavalcante, Goiás, Brasil: Resultados Parciais. IX Simpósio Nacional do Cerrado; 2008; Brasília, Brasil. *Anais. II Simpósio Internacional Savanas Tropicais.* 2008.
- 5- Mazza MCM, Mazza CAS, Sereno JRB, Santos SA, Pellegrin AO. Etnobiologia e conservação do bovino Pantaneiro. Corumbá: Embrapa;1994. 61p.
- 6- Egito AA, Paiva SR, Albuquerque MSM, Abreu UGP, McManus C, Castro STR, Mariante AS, Grattapaglia D. Desempenho de marcadores de DNA para determinação de parentesco na raça bovina Pantaneira. XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2005; Goiânia, Brasil. *Anais. Soc. Bras. Zootec.* 2005.

- 7- Amarante MRV, Womack JE. Marcadores moleculares mapeados no cromossomo Y bovino, com emprego do painel de células somáticas híbridas irradiadas (WG-RH). V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal; 2004; Pirassununga, Brasil. Anais. Soc. Bras. Melhor. Ani. 2004.
- 8- Maudet C, Luikart G, Taberlet P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. Jor. Anim. Sci. 2002;80:942-950.
- 9- Kumar D. DNA markers for the differentiation of farm animal breeds. In: Sahai R, Vijn RK, editors. Domestic animal diversity: conservation and sustainable development. Karnal: SI-Publications; 2000. p.305-312.
- 10- Egito AA, Albuquerque MSM, Mariante AS. Situação atual da caracterização genética animal na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. I Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe; 1999; Brasília, Brasil. Anais. Emb. Rec. Gen. Biotec. 1999.
- 11- Almeida GM. Caracterização genética dos bovinos da raça pé-duro utilizando marcadores moleculares ancorados. Dissertação. Teresina: Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias; 2008.
- 12- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Reconhece a raça Curraleiro Pé-Duro. Portaria nº 1.150. Online. 2012; Seção 1, nº 242, Código 00012012121700002. Diário Oficial da União. [acesso 4 mai 2015]. Disponível em: <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>.
- 13- Primo AT. El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. Arch. Zootec. 1992;41(154):421-432.
- 14- Correa Filho, V. A propósito do boi pantaneiro. Rio de Janeiro, Paulo Pongetti e Cia, 1926.

- 15- Marques Júnior HR, Juliano RS, Abdo Y. Bovino Pantaneiro: retrospectiva histórica e fomento à raça, experiência da parceria entre Embrapa Pantanal, Agropecuária Preservação da Fauna e Universidade Católica Dom Bosco. Multitem. 2012;42:71-86.
- 16- Barros EA, Ribeiro MN, Almeida MJO, Araújo AM. Estrutura populacional e variabilidade genética da raça caprina Marota. Arch. Zootec. 2011;60(231):543-552.
- 17- Silva MC, Paulini F, Lopes FB, Fioravanti MCS, Sereno JRB. A heterogeneidade dos sistemas de produção agropecuários e da paisagem: um ponto de partida para compreender a conservação de recursos genéticos animais. Enc. Bio. 2013;9(16):1-24.
- 18- Ramalho MAP, Santos JB, Pinto CABP, Souza EA, Gonçalves FMA, Sousa JC. Genética na agropecuária, 3ª ed. Lavras: UFLA; 2012. 565p.
- 19- Menezes MPC. Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias. Tese. Areia: Universidade Federal da Paraíba, Universidade Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará; 2005.
- 20- Ollivier TL, Foulley JL. Aggregate diversity: new approach combining within-and between-breed genetic diversity. Lives. Prod. Sci. 2005;95:247-254.
- 21- Silva PVC. Caracterização genética de javalis por meio de marcadores microssatélites. Dissertação. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2007.
- 22- Menezes MPC, Martinez AM, Ribeiro MN, Pimenta Filho EC, Delgado Bermejo JV. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. Rev. Bras. Zootec. 2006;35(4):1336-1341.
- 23- Rocha LL. Estudo genético de populações caprinas locais e exóticas através de marcadores microssatélites. Tese. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia; 2009.

- 24- Silva MC, Fioravanti MCS, Solano GA, Silva DC, Iskandar GR, Moura MI, Rocha FEC, Lopes FB, Sereno JRB. Análise do discurso em reunião para o registro genealógico de bovinos Curraleiro Pé-Duro no Brasil. *Actas Iberoamer. Conser. Ani.* 2013;3:188-193.
- 25- Ferro DAC, Miyagi ES, Juliano RS, Arnhold E, Fioravanti MCS, Ferro RAC, Silva BPA. Proposta de grupos de acasalamento para bovinos pantaneiro por meio da caracterização morfológica. *Actas Iberoamer. Conser. Ani.* 2015;6:81-91.
- 26- Faria FJC, Vercesi Filho AE, Madalena FE, Josahkian LA. Estrutura genética da raça Gir Mocha registrada no Brasil. *Bol. Ind. Ani.* 2006;63(3):135-141.
- 27- Cunha EE, Euclides RF, Torres RA, Sarmento JLR, Carneiro PLS, Carneiro APS. Impactos de se ignorarem os efeitos genéticos não-aditivos de dominância na avaliação genética animal. *Rev. Bras. Zootec.* 2009;38(12):2354-2361.
- 28- Salman AKD, Giachetto PF, Malago W. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. *Rev. Elet. Vet.* 2009;10:1-16.
- 29- Coutinho LL, Rosário MF, Jorge EC. Biotecnologia animal. *Est. Avan.* 2010;24:123-47.
- 30- Jones N. et al. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phy.* 2009;183(4):935-966.
- 31- Faleiro FG. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2007. 102p.
- 32- Taberlet P, Valentini A, Rezael H, Naderi S, Pompanon F, Negrini R, Marsan PA.- Are cattle, sheep, and goats endangered species? *Mol. Ecol.* 2008;17:275-284.
- 33- Garcia JF. Biotecnologia da reprodução em bovinos. II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada; 2006; Londrina, Brasil. *Anais. Simp. Inter. Rep. Ani. Apl.* 2006;2:195-201.

- 34- Fabuel E, Barragán C, Silió L, Rodríguez MC, Toro MA. Analysis of genetic diversity and conservation priorities in Iberian pigs based on microsatellite markers. *Hered.* 2004;93:104-113.
- 35- Martinez AM, Acosta J, Veja-Pla JL, Delgado JV. Analysis of the genetic structure of the canary goat populations using microsatellites. *Lives. Sci.* 2006;102:140-145.
- 36- Barbosa ACOF. Avaliação de critérios de compatibilidade entre pares de “primers” para otimização de sistemas multiplex de genotipagem. Dissertação. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas; 2010.
- 37- Gonçalves RW, Costa MD, Rocha Júnior VR, Costa MR, Silva ESPE, Ribeiro Filha AM. Efeito da endogamia sobre características reprodutivas em um rebanho da raça Mangalarga Marchador. *Rev. Bras. Saú. Prod. Anim.* 2011;12(3):641-649.
- 38- Duarte FAM, Perez AM, Pena SD, Barros MPM, Rossi EO. A avaliação do DNA como prova forense. Ribeirão Preto: FUNPEC; 2001. 283p.
- 39- Vieira DP. Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações. [online] 2013; [acesso 22 out 2013]. Disponível em: <http://www.etall.hpg.ig.com.br/aula1b.pdf>.
- 40- Corrêa EM, Possik PA. Biologia molecular: técnicas moleculares. Academia de Ciência e Tecnologia [online] 2014; [acesso 5 nov 2014]. Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br/index.php/ciencia/biologia-molecular/biologia-molecular-tecnicas-moleculares/>.
- 41- Zaros LG, Silva NA, Ninov K. Sequenciamento de DNA. Sequenciamento: kit amersham (ge) [online] 2008; [acesso 2 fev 2016]. Disponível em: <file:///D:/Meus%20Documentos/Downloads/Sequenciamento.pdf>.
- 42- Queiroz SA. Efeito da endogamia sobre características de crescimento de bovinos da raça Gir no Brasil. *Rev. Bras. Zootec.* 2000;29(4):1014-1019.

- 43- Carvalheiro R, Pimentel ECG. Endogamia: possíveis consequências e formas de controle em programas de melhoramento de bovinos de corte. II Workshop em Genética e Melhoramento na Pecuária de Corte; 2004; Jaboticabal, Brasil. Anais. GEMPEC. 2004.
- 44- Kim E, Sonstegard TS, Van Tessel CP, Wiggans G, Rothschild MF. The relationship between runs of homozygosity and inbreeding in Jersey cattle under selection. Plos One. 2015;10:1-17.
- 45- Meuwissen T. Genetic management of small populations: a review. Acta Agricult. Sca. Sect. 2009;59:71-79.
- 46- Crispim AC. Estudo da endogamia e da estrutura de populações de codornas de corte sob seleção. Dissertação. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias; 2013.
- 47- Cunha EE, Guedes DGP, Melo TP. Influência de acasalamentos dirigidos sobre a endogamia média e o ganho genético em gerações discretas de seleção fenotípica. 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2011; Belém, Brasil. Anais. Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2011.
- 48- Araújo AM. Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA. Tese. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias; 2004.
- 49- Pereira AB, Almeida NF. Genética, biotecnologia e agricultura, 1ª ed. Porto: SIG; 2005. 96p.
- 50- Ott J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. Amer. J. Hum. Gen. 1992;51:283-290.
- 51- Egito AA. Diversidade genética, ancestralidade individual e Miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em Microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação. Tese. Brasília: Universidade de Brasília, Ciências Biológicas; 2007.

- 52- Mcmanus C, Paiva S, Corrêa PS, Seixas L, Melo CB. Estatísticas para descrever genética de populações. [online] 2016; [acesso 10 set 2016]. Disponível em: <http://www.animal.unb.br>.
- 53- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Amer. J. Hum. Gen.* 1980;32:314-331.
- 54- Nicholas FW. Introdução à genética veterinária. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2011. 347p.
- 55- Mariz TMA. Caracterização zoométrica, estrutura populacional e índices reprodutivos da raça Sindí no Brasil. Tese. Areia: Departamento de Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba; 2010.
- 56- Carneiro PLS, Euclides RF, Silva MA, Lopes PS, Torres RA, Carneiro APS, Torres Filho RA. Efeito de erros de pedigree na seleção. *Rev. Bras. Zootec.* 1999;28:269-274.
- 57- Curi RA, Lopes CR. Teste de paternidade em bovinos. *Biotec. Ciênc. Desenv.* 2001;21:40-45.
- 58- CRV LAGOA. Programas Sire Match. [online] 2012; [acesso 2 fev 2016]. Disponível em: <http://www.crvlagoa.com.br/sirematch.asp>.
- 59- Carvalheiro R, Neves HHR, Queiroz SA. Combinando acasalamento associativo positivo e restrição sobre a endogamia visando maior progresso genético. 44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2007; Jaboticabal, Brasil. Anais. Jaboticabal: Soc. Bras. Zootec. 2007.
- 60- Silveira JC, Mcmanus C, Mascioli AS, Silva LOC, Silveira AC, Garcia JAS, Lauvandini H. Fatores ambientais e parâmetros genéticos para caracterização produtivas e reprodutivas em um rebanho nelore no estado de Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Zoot.* 2004;33(6):1432-1444.

- 61- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Embrapa Gado de Leite. Sistemas de acasalamento. [online] 2016; [acesso 15 mar 2016]. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/sistemaproducao/498-sistemas-de-acasalamento>.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE BOVINOS CURRALEIRO PÉ-DURO UTILIZANDO-SE MARCADORES MICROSSATÉLITES

☒ *Artículo/Article*

☐ *Nota corta/Short note*

☐ *Revisión/Revisión*

☐ *Carta al Editor/Letter to the Editor*

☐ *In Memoriam*

Área de genética y etonología/Area of genetics and ethnology

Study of genetic diversity of Curraleiro Pé-Duro cattle using microsatellite markers

Bovinos em extinção.

Marcadores moleculares.

Raça local brasileira.

Seleção de reprodutores.

Testes de paternidade.

Cattle in extinction.

Molecular markers.

Brazilian local breed.

Selection of breeders.

Paternity tests.

Resumo

As raças locais brasileiras constituem importante patrimônio genético e a variabilidade genética pode ser útil em programas de seleção e melhoramento genético. Com este estudo objetivou-se verificar a diversidade genética de animais da raça local brasileira Curraleiro Pé-Duro para propor acasalamentos. Foram analisadas amostras de pelos de 1073 animais, de 19 rebanhos. Realizou-se a amplificação de 27 microsatélites de DNA, mediante PCR. Foi calculado o número médio de alelos por loco, as frequências alélicas, as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) por meio do programa Microsatellite Toolkit. Os valores de coeficiente de consanguinidade foram calculados utilizando-se o programa GENETIX v. 4.05 e a prova de equilíbrio Hardy-Weinberg o GENEPOP v. 3.1c. Para cada animal foi emitido um parecer do controle de filiação. Observou-se grande variabilidade alélica para a raça, com número médio de alelos de 8,70. Os valores médios de H_e e H_o foram 0,713 e 0,653, respectivamente. O valor médio de PIC foi 0,671. A probabilidade de exclusão combinada foi 0,99992. Os lotes de acasalamentos foram sugeridos na proporção macho:fêmea mínima de 1:13 à máxima de 1:26, dependendo do tamanho do rebanho. Os testes de paternidade possibilitaram a elaboração de programas reprodutivos individuais para os rebanhos, com vistas a melhorar a gestão destas populações principalmente sob o ponto de vista genético.

Summary

The Brazilian local breeds constitute an important genetic heritage and genetic variability can be useful in genetic improvement and selection programs. The objective of this study was to verify the genetic diversity of Brazilian local breed Curraleiro Pé-Duro to propose mating. Samples of hair bulb from 1073 animals from 19 herds were analyzed. Amplification of 27 DNA microsatellites was performed by PCR. The average number of alleles per locus, allele frequencies, heterozygosities expected (H_e) and observed (H_o) and polymorphic information content (PIC) were calculated using the Microsatellite Toolkit program. The values for coefficient of coancestry were calculated using the GENETIX v. 4.05 and the Hardy-Weinberg equilibrium test the GENEPOP v. 3.1c. For each animal an opinion of the affiliation control was issued. Large allelic variability was observed for the breed, with an average number of alleles of 8.70. The average values of H_e and H_o were 0.713 and 0.653, respectively. The average value of PIC was 0.671. The probability of combined exclusion was 0.99992. The mating was suggested at the minimum male:female ratio of 1:13 to the maximum of 1:26, depending on the size of the herd. Paternity testing enabled the development of individual reproductive programs for herds in order to improve the management of these populations, mainly from the genetic point of view.

Introdução

As raças locais brasileiras constituem importante patrimônio genético e a variabilidade genética pode ser útil em programas de seleção e melhoramento genético. Neste contexto, o manejo reprodutivo deve ser otimizado, pois na maioria dos rebanhos brasileiros de conservação está inadequado, com acasalamentos endogâmicos, promovendo o desaparecimento de genes importantes (Silva et al. 2016).

A diversidade entre animais tem grande relevância para a gestão dos recursos genéticos de determinada população, já que um indivíduo pode apresentar inúmeras características fenotípicas e genéticas diferentes dos demais, o que poderia melhorar as raças quando as relações de parentesco são pequenas. Essa situação reforça a importância do estudo da relação de parentesco entre animais, evidenciando o distanciamento genético entre eles para que se possa intercambiar material genético entre rebanhos, principalmente de raças que se encontram em risco de extinção como a Curraleiro Pé-Duro.

Outro ponto que deve ser destacado nessa problemática são as características relacionadas à adaptação destes bovinos em diferentes locais no país, sobrevivendo em ambientes adversos, sem nunca terem sido submetidos a programas de melhoramento genético, o que poderia ser útil em situações futuras, devendo ser este, entre outros fatores, um dos motivos que indicam a necessidade da conservação destes recursos genéticos animais.

Para realizar a seleção de reprodutores em rebanhos com poucos animais, que não tenham escrituração zootécnica, acompanhamento técnico e com criadores isolados entre si, como o que acontece com raças locais brasileiras, encontra-se grande dificuldade, já que os parâmetros genéticos não são considerados por parte dos produtores, que se baseiam apenas em características morfológicas e por vezes funcionais, fazendo com que a endogamia dos rebanhos aumente.

No acasalamento endogâmico, os indivíduos selecionados para serem os pais da próxima geração são aparentados entre si. O principal efeito genético da endogamia é o aumento da homozigose, além do aparecimento de genes recessivos que podem provocar diminuição no mérito genético individual. O coeficiente de endogamia representa a medida do aumento da homozigose, sendo dependente do tamanho da população, considerando-se que quanto menor

a população, em gerações anteriores, maior é o número de ancestrais comuns e maior será o coeficiente de endogamia (Breda et al. 2004).

Ao se realizar a seleção de animais para os acasalamentos deve-se estabelecer o sistema que será utilizado. Os principais sistemas de acasalamentos são monta natural, monta controlada ou dirigida e inseminação artificial. Na monta controlada, os touros são mantidos separados das fêmeas e quando o cio é detectado a fêmea é encaminhada para junto do touro, trata-se de um método importante para identificação da paternidade. A monta natural se refere aos touros mantidos junto ao rebanho de fêmeas durante toda a estação de monta. Em relação à inseminação artificial, esta é uma técnica caracterizada pela oportunidade de melhorias produtivas do rebanho com a utilização de reprodutores de alto potencial genético (Valle et al. 2000).

Como ferramenta a ser utilizada para auxiliar na seleção de reprodutores para a utilização em acasalamentos, necessários para os rebanhos em extinção, tem-se os marcadores moleculares, destacando-se os do tipo microsatélites de DNA.

As principais vantagens na utilização de marcadores microsatélites estão relacionadas a precocidade de avaliação dos animais para características específicas, em razão da tecnologia que utiliza amostras de DNA, permitindo análises momentos após o nascimento ou durante a fase embrionária, podendo ser inclusive utilizada em programas de produção *in vitro* e transferência de embriões, agilizando e otimizando os sistemas de seleção genética e produção animal. Estes marcadores também têm importância na realização de testes de paternidade e na identificação da distância genética entre animais (Garcia & Porto-Neto 2006).

A realização de estudos específicos, análises e avaliações que resultam na caracterização genética do rebanho Curraleiro Pé-Duro são imprescindíveis para desenvolver programas de melhoramento genético, acompanhamento e monitoramento dos rebanhos, pois viabiliza a seleção de reprodutores, proporcionando a implantação de sistemas adequados de acasalamentos, evitando-se a endogamia, proporcionando maior diversidade genética entre raças e dentro destas e auxiliando nos processos de conservação *in situ* e *ex situ* de populações ameaçadas de extinção.

Objetivou-se com este trabalho verificar a diversidade genética de animais da raça local brasileira Curraleiro Pé-Duro para propor acasalamentos.

Material e métodos

Para a realização das provas genéticas de atribuição de parentesco e diversidade genética foram analisadas amostras de pelos de 1073 animais, machos e fêmeas com diferentes idades, pertencentes a 19 rebanhos da raça bovina Curraleiro Pé-Duro, distribuídos em propriedades localizadas nos Estados de Goiás, Piauí, Tocantins e no Distrito Federal (Tabela I). O sistema de criação utilizado nas propriedades era extensivo, sendo os animais criados à pasto com suplementação mineral *ad libitum*. Todos os animais foram identificados por brincos numerados e marcados.

Foram colhidas amostras de pelos em envelopes de papel e estas foram armazenadas em temperatura ambiente e, posteriormente enviadas para análises genéticas e moleculares no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da Universidade de Córdoba, Espanha. Para a extração de DNA das amostras de pelo utilizou-se o método Walsh (Walsh et al. 1991).

Realizou-se a amplificação de 27 microsatélites de DNA recomendados pela FAO/ISAG (Tabela II), mediante a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Os fragmentos de DNA obtidos foram submetidos a eletroforese em sequenciador automático ABI377XL

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A tipificação alélica e análise dos fragmentos foram realizadas com o auxílio dos programas Genescan Analysis 3.1.2 e Genotyper 2.5.2 respectivamente, por meio do programa Genescan[®] 400HD ROX Size Standard. Estas atividades foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da Universidade de Córdoba, Espanha. A probabilidade de exclusão por marcador (PE) e para o conjunto de marcadores (PEC) se calculou com o auxílio do programa informático CERVUS v.3.0 (Marshall et al. 1998).

Foi calculado o número médio de alelos por loco (NA), as frequências alélicas, as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) por marcador microssatélite por meio do programa Microsatellite Toolkit software para Excel (Park 2001).

Os valores de coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) com intervalo de confiança de 95% foram calculados utilizando-se o programa informático GENETIX v. 4.05 (Belkhir et al. 2003). A prova de equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW) foi realizada pelo programa GENEPOP v. 3.1c (Raymond & Rousset 1995), que aplica o teste exato de Fisher usando o método em cadeia de Monte Carlo Harkov (Guo & Thompson 1992).

Estas análises possibilitaram a realização dos testes de paternidade, onde foram efetuados controles de filiação por meio da comparação direta da fórmula genética do animal em estudo com as fórmulas dos pais propostos. Para cada animal foi emitido um parecer do controle de filiação, podendo este ser compatível, negativo para pai e mãe, negativo para pai, negativo para mãe, negativo para pai ou mãe.

Foram sugeridos acasalamentos para estes rebanhos após a análise dos testes de paternidade dos animais, indicando-se os possíveis touros e as fêmeas, dividindo-se os rebanhos de cada propriedade em lotes, evitando-se a utilização de reprodutores aparentados com as fêmeas. Para a proposta de acasalamentos observou-se a distância genética entre os pares de indivíduos comparados, sendo que os touros que possuíam filhas no lote não poderiam ser utilizados neste e para aqueles que tinham grande quantidade de filhas no rebanho sugeriu-se a troca ou substituição por outro sem parentesco, com vistas a evitar os acasalamentos consanguíneos. As sugestões para os acasalamentos foram realizadas considerando-se também uma proporção macho:fêmea que poderia ser utilizada em qualquer sistema de acasalamentos, trabalhando-se com número de fêmeas compatível com o objetivo do programa, a conservação de recursos genéticos animais.

Resultados

Os resultados da análise dos 27 marcadores microssatélites de DNA utilizados no estudo de caracterização genética do bovino Curraleiro Pé-duro estão apresentados na Tabela III. Todos os microssatélites apresentaram-se informativos e polimórficos, mostrando no mínimo 5 alelos para o microssatélite INRA035 e no máximo 13 alelos para o marcador HAUT24. Observou-se grande variabilidade alélica para a raça Curraleiro Pé-Duro, onde o número médio de alelos por loco foi 8,70.

A heterozigosidade esperada variou entre 0,473 e 0,821, enquanto a heterozigosidade observada variou entre um mínimo de 0,361 e um máximo de 0,843 para o marcador TGLA122. Os valores médios de H_e e H_o foram 0,713 e 0,653, respectivamente. O valor médio de conteúdo de informação polimórfica foi 0,671, sendo os marcadores TGLA053 e TGLA122 os que apresentaram os maiores valores de PIC, 0,793 e 0,790, respectivamente.

Na Tabela III está demonstrado também o valor de desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg (p-valor), indicando que 14 dos 27 marcadores se desviaram significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) mostrou que nove microssatélites detectaram um excesso significativo de homozigotos na população (Tabela III).

Os resultados do controle de filiação realizado com a utilização de marcadores microssatélites de DNA demonstraram uma probabilidade de exclusão combinada (PEC) de 0,99992 quando os dois progenitores eram conhecidos. Todas as amostras foram genotipadas com o painel de microssatélites de DNA e suas fórmulas genéticas ficaram depositadas no Laboratório de Genética Molecular Aplicada de Córdoba para futuras provas de identificação individual e controle de filiação em um banco de dados.

O controle de filiação dos rebanhos analisados está apresentado na Tabela IV. O resultado foi: 1. compatível com ambos os pais indicou que o indivíduo avaliado foi compatível com o pai e a mãe propostos, sendo que o genótipo do indivíduo é fruto da combinação dos alelos presentes nos genótipos de ambos os progenitores; 2. incompatível com pai e mãe, sendo o indivíduo incompatível com a mãe e com o pai propostos, o genótipo do indivíduo não têm possibilidade de ter surgido da combinação alélica dos genótipos dos progenitores; 3. negativo para pai, o indivíduo é compatível com a mãe proposta, mas é incompatível com o pai proposto, sendo que o pai não compartilha nenhum alelo com o indivíduo; 4. negativo para mãe, o indivíduo é compatível com o pai proposto, mas é incompatível com a mãe proposta; 5. negativo para pai ou mãe, onde um dos progenitores propostos é incompatível com o indivíduo, mas não se pode determinar qual deles é o incompatível, neste caso um dos alelos do genótipo do indivíduo está presente em ambos os progenitores, mas o outro não, sendo assim, não se pode saber qual deles trazem este alelo.

Na Tabela IV, quatro rebanhos, C9, C11, C13 e C14 demonstraram 100% de incompatibilidade com ambos os pais propostos.

Conforme a Tabela IV, os rebanhos C7, C8 e C18 apresentaram compatibilidade com o proposto pai inferior a 10% do total de indivíduos amostrados. Os grupos C1, C5, C6 e C15 demonstraram compatibilidade com o suposto pai entre 20% e 30% do total de amostras dos seus grupos, enquanto o C2 demonstrou esta característica entre 30% a 40% do total de indivíduos amostrados em seu rebanho. Já os grupos C4, C12, C16 e C17 obtiveram entre 40% e 50% de pais compatíveis em seus rebanhos. Quanto a compatibilidade genética com as mães propostas, apenas os grupos C16 e C17 apresentaram esta característica, sendo os valores de 2,08% e 13,63%, respectivamente. Os rebanhos C4 e C17 apresentaram compatibilidade com ambos os pais propostos de 2,63% e 4,54%, respectivamente.

A partir dos resultados dos testes de paternidade foram sugeridos acasalamentos para os rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro (Tabela V), mediante a formação de lotes, rodízio de touros, utilização de diferentes sistemas de acasalamentos como monta natural, monta controlada e inseminação artificial, para estimular o aumento do número de animais e o controle da endogamia, visando o início de um trabalho de melhoria da gestão genética destas raças, com planejamento. Foi sugerido o descarte de touros com muitos filhos no rebanho e de machos aparentados, sendo que este pode ser realizado por meio de permutas/intercâmbio de material genético com outros produtores.

Os acasalamentos sugeridos consideraram o número médio de fêmeas em fase reprodutiva nos rebanhos, o número de touros das propriedades, a facilidade para execução dos programas pelos criadores e principalmente os resultados de paternidade, onde os touros com grande número de filhas no rebanho foram descartados e sugeriu-se a aquisição de outros

touros. Os lotes de acasalamentos foram montados na proporção macho:fêmea mínima de 1:13 à máxima de 1:26, dependendo do tamanho do rebanho.

Discussão

A raça Curraleiro Pé-Duro apresentou número médio de alelos por loco de 8,70, número semelhante ao encontrado por Carneiro et al. (2007) para a raça Nelore que foi 8,20 alelos por loco, em trabalho que avaliou onze marcadores microssatélites de DNA, enquanto Rodrigues et al. (2002) em estudo que avaliou a raça Gir, encontraram 7,00 alelos por loco.

A média de alelos por loco encontrada na raça Curraleiro Pé-Duro mostrou que apesar de ser um rebanho que se encontra em risco de extinção, tendo um número reduzido de animais, se compara às raças que possuem número expressivo de indivíduos, como a raça Nelore, considerada a mais criada no Brasil. Apesar da população pequena quando comparada com outras comerciais, esta raça local demonstrou que a população efetiva da raça tem sido importante para manter a variabilidade genética intra-racial, tendo reprodutores e matrizes que contribuem efetivamente para evitar a perda de alelos ao longo das gerações. Neste conceito, a variabilidade genética na população justifica-se na garantia de respostas à seleção, seja a curto ou longo prazo e principalmente para fins de conservação de recursos genéticos e de acordo com Yorinori & Kiihl (2001) e Hill (2000) representa também maiores chances de estabilidade da produção, o que pode auxiliar a raça em estudo em programas de conservação e melhoramento genético.

Os valores médios de H_e (0,713) e H_o (0,653) se mantiveram conforme aos valores esperados para os locos. Carneiro et al. (2007) encontraram valores médios de H_o para a raça Nelore de 0,42, considerado um valor baixo em comparação com outras raças, sendo o marcador que apresentou o valor máximo de H_o em seu estudo o TGLA122 (0,92), concordando com os resultados aqui obtidos, onde este marcador também demonstrou o maior valor de H_o (0,843). Rendo et al. (2004) e Radko et al. (2005) observaram valores de H_o entre 0,60 e 0,75 ao utilizarem raças autóctones em extinção e raças de ampla representação, semelhantes aos valores médios encontrados neste estudo. Valores altos de heterozigossidade observada (0,88) foram relatados por Almeida et al. (2000) em Brangus Ibagé.

A heterozigossidade representa uma medida de variação em uma população por quantificar os heterozigotos para um loco ou todos os locos. Os valores encontrados neste estudo para H_e e H_o indicaram a diversidade genética da raça Curraleiro Pé-Duro com valores altos comparando-se com raças em extinção e raças comerciais. As diferenças encontradas entre locos marcadores indicam, de acordo com Sánchez (2008) que em certos locos os alelos estão sujeitos a maior pressão de seleção, que resulta em variações alélicas.

O valor médio encontrado para o PIC neste estudo foi 0,671, sendo os marcadores com os maiores valores o TGLA053 (0,793) e TGLA122 (0,790). O valor médio do PIC encontrado por Carneiro et al. (2007) foi 0,640, valor abaixo do encontrado neste estudo. Altos valores de PIC (0,86) para o microssatélite TGLA122 também foram relatados por Almeida et al. (2000) em Brangus Ibagé.

Considerando-se que o PIC com valor superior a 0,50 indica que o marcador é muito informativo, de acordo com Botstein et al. (1980) todos os marcadores foram considerados muito informativos, se tratando de detecção de variabilidade genética no bovino Curraleiro Pé-Duro, com exceção do microssatélite INRA035 que é medianamente informativo, com PIC 0,435.

De acordo com os resultados obtidos, os marcadores microssatélites utilizados indicaram ser eficientes para determinação de paternidades. Segundo Yang et al. (2013) os microssatélites têm sido muito eficazes na detecção de variações genéticas no DNA por serem numerosos, distribuídos por todo o genoma, possuírem genética mendeliana e ainda apresentarem caráter codominante.

O valor de desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg (p-valor) indicou que a população analisada se encontra em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Acredita-se que existe algum tipo de desequilíbrio na população analisada devido um excesso significativo de homozigotos ou uma possível subestrutura genética. Este resultado se assemelha ao encontrado em raças com baixo número de heterozigotos como Nelore e Holandesa, fato que pode ser explicado por acasalamentos endogâmicos, segundo Maudet et al. (2002). No entanto, uma explicação que parece mais provável para raças com pequena população como é o caso da Curraleiro Pé-Duro, seria a subdivisão populacional e a deriva genética, fatores que também foram levantados por Martin-Burriel et al. (1999) em seus estudos.

Analisando-se o F_{IS} observou-se que nove microssatélites detectaram excesso de homozigotos na população. Considerando que o coeficiente de consanguinidade mede a probabilidade de dois alelos de um mesmo loco serem idênticos por descendência, verificou-se a existência de endogamia no rebanho. Entretanto, ao analisar o F_{IS} juntamente com os outros índices que avaliam a diversidade genética, como número de alelos por loco, H_e , H_o e EHW observou-se que apesar de alguns marcadores terem apresentado excesso de homozigotos, em rebanhos com acasalamentos não direcionados e com pequeno número de animais e podendo ainda ter efeito da migração e deriva genética, estes dados são facilmente compreendidos, podendo-se inferir que a endogamia apresentada ficou dentro de parâmetros já esperados, comprovando a variabilidade genética presente nesta raça.

Analisando-se os resultados foi verificado que o bovino Curraleiro Pé-Duro apresentou elevada diversidade genética intra-racial. No entanto, seria interessante acompanhar a evolução da diversidade genética por anos consecutivos para verificar se a gestão genética da mesma está correta. Como a manutenção da variabilidade genética intra-racial é um aspecto importante para a conservação animal é necessário descrever a sua estrutura, avaliando se existem desequilíbrios e se ocorreram afunilamentos ao longo das gerações, considerando que a população seja um conjunto de indivíduos em permanente renovação. Segundo Carolino et al. (2008) para realizar a conservação de recursos genéticos animais deve-se fazer uma caracterização demográfica das populações, que inclui a dimensão das criações, a faixa etária, a utilização excessiva de poucos reprodutores e as trocas de material genético entre as criações.

O valor para probabilidade de exclusão combinada de 0,99992 encontrado quando os dois progenitores eram conhecidos, de acordo com o teste de paternidade, comprovou a eficiência dos marcadores utilizados neste estudo, onde valores maiores que 0,999 para todos os locos são considerados satisfatórios, segundo Marshall et al. (1998).

O banco de dados do Laboratório de Genética Molecular Aplicada de Córdoba com os 1073 animais amostrados neste estudo aumentou a quantidade de informações genealógicas a respeito de animais da raça Curraleiro Pé-Duro, o que pode facilitar estudos futuros, auxiliar na gestão de populações e ainda na conservação da mesma.

Nos quatro rebanhos da raça estudada, C9, C11, C13 e C14 (Tabela IV), que demonstraram 100% de incompatibilidade com ambos os pais propostos, possivelmente os progenitores não se encontravam mais entre os animais do rebanho ou entre os animais amostrados. Já para os grupos C4, C12, C16 e C17 que obtiveram entre 40% e 50% de pais compatíveis em seus rebanhos são indicadas formações de novos lotes para reprodução,

visando maior controle da consanguinidade, uma vez que, aproximadamente a metade de cada um dos rebanhos estaria com seus progenitores nestes.

Os testes de paternidade possibilitaram a elaboração de programas reprodutivos para os rebanhos, com vistas a melhorar a gestão genética destas populações. O esquema reprodutivo foi proposto evitando-se a endogamia nos rebanhos, buscando aumentar a variabilidade genética.

Verificou-se que na maioria dos rebanhos estudados não são realizados manejos frequentes ou rotineiros dos bovinos, sendo estes criados soltos, longe das sedes das fazendas e em pastos nativos. Diante disso, foi proposto que o sistema de acasalamentos dos rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro fosse escolhido pelos criadores, por conhecerem a realidade de suas propriedades, o acesso às tecnologias, a disponibilidade de infraestrutura e mão-de-obra, dentre outros fatores. De acordo com Gama et al. (2004) raças autóctones portuguesas foram inseridas em um programa de melhoramento genético, em que o objetivo foi tornar a raça mais eficiente e competitiva em relação as raças exóticas e que se encontrou dificuldade generalizada quanto ao uso da inseminação artificial, sendo esta ferramenta pouco utilizada, tornando a difusão de reprodutores selecionados e as avaliações genéticas comprometidas. Este exemplo demonstra que o sistema de acasalamentos pode ser um entrave na implantação de qualquer programa, se não condizer com a realidade de cada criação.

O rodízio de touros sugerido para os rebanhos deve ser considerado em função do tempo de utilização dos reprodutores nos rebanhos, da formação dos lotes, da disponibilidade de touros dissimilares geneticamente das fêmeas, respeitando-se a formação dos lotes e as designações das paternidades, de forma que as novilhas que entrarão para o programa de acasalamentos posteriormente, não sejam acasaladas com seus pais ou parentes e sim que formem outros lotes com outros reprodutores, aumentando a diversificação de reprodutores e matrizes, principalmente se for adotado o método de inseminação artificial.

Estes acasalamentos devem ser cuidadosamente analisados, pois influenciam diretamente na manutenção da variabilidade genética intra-racial ao evitar a perda de genes ou alelos entre as gerações e na variabilidade genética inter-racial, contribuindo para se evitar a extinção de raças.

Conclusão

A raça Curraleiro Pé-Duro apresentou grande variabilidade genética intra-racial, demonstrando que apesar de estar em extinção possui rebanhos com muita diversidade genética para acasalamentos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Fapeg) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), pelos recursos financeiros concedidos.

Bibliografia

Almeida, S, Machado, M, Steigleder, C et al. 2000, Genetic diversity in a Brazilian bovine herd based on four microsatellite loci, *Genet. Mol. Biol.*, vol. 23, pp.347-50.

- Barendse, W et al. 1994, A genetic linkage map of bovine genome, *Nature genetics*, vol. 6, pp. 227-35.
- Belkhir, K, Borsa, P, Chikhi, L, Raufaste, N & Bonhomme, F 2003, Genetix: 4.05 Logiciel sous WindowsTM pour la genetique des populations, Montpellier: U.d. Montpellier, France.
- Bishop, M & Kappes, S 1994, A genetic linkage map for cattle, *Genetics*, vol. 136, pp. 619-39.
- Botstein, D, White, R, Skolmick, H & Davis, R 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *American Journal of Human Genetics*, vol. 32, pp. 314-31.
- Breda, F, Euclides, R, Pereira, C & Torres, R 2004, Endogamia e limite de seleção em populações selecionadas obtidas por simulação, *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 33, no. 6, sup. 2, pp. 2017-25.
- Brezinsky, L, Kemp, J & Teale, A 1993, ILSTS006: a polymorphic bovine microsatellite, *Anim. Genet.*, vol. 24, pp. 7.
- Carneiro, T, Gonçalves, E, Schneider, M & Silva, A 2007, Diversidade genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol. 59, no. 5, pp.1257-62.
- Carolino, N, Gama, LT & Vicente, A 2008, Retrospectiva sobre estudos demográficos em raças autóctones Portuguesas, In: Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos, 9., *Anais...* Mar del Plata: SICURZ, pp. 523-26.
- Gama, LT, Carolino, N, Costa, MS & Matos, CP 2004, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Estação Zootécnica Nacional, *Recursos genéticos animais em Portugal*: relatório nacional, Portugal, 68pp.
- Garcia, J & Porto-Neto, L 2006, Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões, *Acta Scientiae Veterinariae*, no. 34, sup. 1, pp. 197-203.
- Guo, S & Thompson, E 1992, Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles, *Biometrics*, vol. 48, pp. 361-72.
- Hill W 2000, Maintenance of quantitative genetic variation in animal breeding programmes, *Livestock Production Science*, vol. 63, pp. 99-109.
- Kappes, S, Keele, R, Stone, R & McGraw, T 1997, A second-generation linkage map of the bovine genome, *Genome Research*, vol. 7, pp. 235-49.
- Kaukinen, J & Varvio, S 1993, Eight polymorphic bovine microsatellites, *Animal Genetics*, vol. 24, pp. 148.
- Marshall, T, Slate, J, Kruuk, L & Pemberton, J 1998, Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations, *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, pp. 639-55.
- Martin-Burriel, I, Garcia-Muro, E & Zaragoza, P 1999, Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites, *Anim. Genet.*, vol. 30, pp.177-82.
- Maudet, C, Luikart, G & Taberlet, P 2002, Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellites DNA analysis, *J. Anim. Sci.*, vol. 80, pp. 942-49.
- Mommens, G, Coppieters, A, Van de Weghe, A & Van Zeveren, Y 1994, Dinucleotide repeat polymorphism at the bovine MM12E6 and MM8D3 loci, *Animal Genetics*, vol. 25, pp. 368.
- Moore, S & Byrne, K 1994, Characterization of 65 bovine microsatellites, *Mamm. Genome*, vol. 5, pp. 84-90.
- Park, S 2001, *Trypanotolerance in West African Cattle and the population genetic effects of selection* University of Dublin, Dublin.

- Radko, A, Zyga, A, Zabek, T et al. 2005, Genetic variability among Polish Red, Hereford and Holstein-Friesian cattle raised in Poland based on analysis of microsatellite DNA sequences, *J. Appl. Genet.*, vol. 46, pp.89-91.
- Raymond, M & Rousset, F 1995, Genepop version 1.2, Population genetics software for exact test and ecumenicism, *Journal of Heredity*, vol. 86, no. 3, pp. 248-9.
- Rendo, F, Iriondo, M, Jugo, B et al. 2004, Analysis of the genetic structure of endangered bovine breeds from the Western Pyrenees using DNA microsatellite markers, *Biochem. Genet.*, vol. 42, pp.99-108.
- Rodrigues, S, Oliveira, D, Teixeira, C et al. 2002, Microsatélites BM2113, ILSTS005, ILSTS008, ETH131 e RM88 em testes de verificação de parentesco para bovinos da raça Gir, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol. 54, pp. 309-13.
- Sánchez, C 2008, *Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética*, Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Genética e Melhoramento, 95pp.
- Silva, BPA, Juliano, RS, Arnhold, E, Fioravanti, MCS, Ferro, DAC, Ferro, RAC & Sereno, JRB 2016, Avaliação fenotípica qualitativa como critério para implantação de programas de acasalamentos em rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro, *Actas Iberoamer. Conser. Ani.*, vol. 27, pp. 64-73.
- Solinas Toldo, S & Fries, R 1993, Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes, *Mamm. Genome*, vol. 4, pp. 720-27.
- Steffen, P & Eggen, A 1993, Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle, *Anim. Genet.*, vol. 24, pp. 121-24.
- Thieven, U, Solinas-Toldo, R, Friedl, J & Masabanda, R 1997, Polymorphic CA-microsatellites for the integration of the bovine genetic and physical map, *Mammalian Genome*, vol. 8, pp. 52-55.
- Vaiman, D et al. 1994, A set of 99 cattle microsatellites: characterization, syntenic mapping, and polymorphism, *Mammalian Genome*, vol. 5, no. 5, pp. 288-97.
- Valle, E, Andreotti, R & Thiago, L 2000. *Técnicas de manejo reprodutivo em bovinos de corte*, Campo Grande: Embrapa/CNPGC, Doc. 93.
- Walsh, P, Metzger, D & Higuchi, R 1991, Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Biotechniques*, vol. 10, pp. 506-13.
- Yang, W et al. 2013, Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 4, pp. 2.
- Yorinori, JT & Kühn, RAS 2001, Melhoramento de plantas visando resistência a doenças. In: *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, cap. 23, pp. 715-35.

Tabela I. Identificação dos criatórios, número de amostras de DNA para os testes de paternidade, sexo dos animais (Fêmea/Macho-bezerros), número de touros supostos pais, código do grupo e total de animais da raça Curraleiro Pé-Duro (*Identification of breeders, number of DNA samples for paternity tests, gender of animals (Female/Male-calves), number of bulls presumed to be fathers, group code and total number of Curraleiro Pé-Duro*).

Identificação da Fazenda	Localização	Nº de amostras	Sexo (F/M)	Nº de touros supostos pais	Código do grupo
Florzeira	Campestre - GO	203	148F / 49M	6	C1
Chiqueiro Dantas	Água Fria - GO	66	56F / 7M	3	C2
Coqueiro	Pirenópolis - GO	59	54F	5	C3
Garganta da Serra	Pilar de Goiás - GO	42	38F	4	C4
Maracanã	Monte Alegre de Goiás - GO	44	34F / 8M	2	C5
Sítio Novo	Mimoso de Goiás - GO	74	53F / 12M	9	C6
Recanto Mogy	Planaltina de Goiás - DF	48	37F / 8M	3	C7
Anhanguera I	Guaraí - TO	80	75F / 2M	3	C8
Barra Mansa II	Porto Nacional - TO	41	39F	2	C9
Ponta D'água	Sucupira- TO	17	16F	1	C10
Recanto Azul	Chapada da Natividade - TO	16	15F	1	C11
Convencido	Campo Maior - PI	29	27	2	C12
Cruz Alta	Campo Maior - PI	37	35F	2	C13
Alto da Cruz	Campo Maior - PI	15	13F	2	C14
Apati	Campo Maior - PI	15	13F	2	C15
Embrapa Meio Norte	São João do Piauí - PI	148	105F / 39M	4	C16
Espírito Santo	Oeiras - PI	49	35F / 9M	5	C17
Faveira	Elesbão Veloso - PI	50	45F / 2M	3	C18
Mangal	Palmeirais - PI	40	37F	3	C19
TOTAL		1073			

Tabela II. Microsatélites analisados (STR), cromossomos (crom.), tamanhos em pares de bases (pb), sequências de *primers* diretos e reversos e referências bibliográficas (*Microsatellites analyzed (STR), chromosomes (crom), base pair sizes (pb), direct and reverse primers sequences and bibliographic references*).

STR	Crom.	Tamanho (pb)	Primers Direto e Reverso		Referência
BM1314	26	173-203	TTCTCTCTCTCTCTCCAAA C	ATCTCAAACGCCAGTGTGG	Bishop & Kappes 1994
BM1818	23	90-110	AGCTGGGAATATAACCAAA GG	AGTGCTTTCAAGGTCCATG C	Bishop & Kappes 1994
BM1824	1	134-165	GAGCAAGGTGTTTTTCCAA TC	CATTCTCCAAGTCTTCCTT G	Bishop & Kappes 1994
BM2113	2	104-130	GCTGCCTTCTACCAAATAC CC	CTTCCTGAGAGAAGCAACA CC	Bishop & Kappes 1994
BM8125	17	128-157	CTCTATCTGTGGAAAAGGT GGG	GGGGGTTAGACTTCAACAT ACG	Bishop & Kappes 1994
CSRM60	10	180-200	AAGATGTGATCCAAGAGAG AGGCA	AGGACCAGATCGTGAAAGG CATAG	Moore & Byrne 1994
CSSM66	14	282-315	ACACAAATCCTTTCTGCCA GCTGA	AATTTAATGCACTGAGGAG CTTGG	Barendse et al. 1994
ETH003	19	254-290	GAACCTGCCTCTCCTGCATT GG	ACTCTGCCTGTGGCCAAGT AGG	Solinas Toldo & Fries 1993
ETH010	5	160-195	GTTTCAGGACTGGCCCTGCT AACA	CCTCCAGCCCACCTTTCTCTT CTC	Solinas Toldo & Fries 1993
ETH185	17	105-145	TGCATGGACAGAGCAGCCT GGC	GCACCCCAACGAAAGCTCC CAG	Steffen & Eggen 1993
ETH225	9	240-260	GATCACCTTGCCACTATTTT CT	ACATGACAGCCAGCTGCTA CT	Steffen & Eggen 1993
HAUT24	22	120-146	CTCTCTGCCTTTGTCCCTGT	AATACACTTTAGGAGAAAA ATA	Thieven et al. 1997
HAUT27	27	203-232	TTTTATGTTTATTTTTTGAC TGG	AACTGCTGAAATCTCCATC TTA	Thieven et al. 1997
HEL09	8	102-136	CCCATTCAGTCTTCAGAGG T	CACATCCATGTTCTCACCAC	Kaukinen & Varvio, 1993
HEL13	11	215-240	TAAGGACTTGAGATAAGGA G	CCATCTACCTCCATCTTAAC	Kaukinen & Varvio, 1993
ILSTS006	7	141-182	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG	ACACGGAAGCGATCTAAAC G	Brezinsky et al. 1993
ILSTS011	14	150-170	GCTTGCTACATGGAAAGTG C	CTAAAATGCAGAGCCCTAC C	Brezinsky et al. 1993
INRA023	3	75-107	GAGTAGAGCTACAAGATAA ACTTC	TAACTACAGGGTGTTAGAT GAACTC	Vaiman et al. 1994
INRA032	11	100-122	AAACTGTATTCTCTAATAG CTAC	GCAAGACATATCTCCATTC CTTT	Vaiman et al. 1994
INRA035	16	153-173	ATCCTTTGCAGCCTCCACAT TG	TTGTGCTTTATGACACTATC CG	Vaiman et al. 1994
INRA037	10	180-200	GATCCTGCTTATATTTAACC AC	AAAATTCCATGGAGAGAGA AAC	Vaiman et al. 1994
INRA063	18	265-285	ATTTGCACAAGCTAAATCT AACC	AAACCACAGAAATGCTTGG AAG	Vaiman et al. 1994
MM12	9	190-225	CAAGACAGGTGTTTCAATC T	ATCGACTCTGGGGATGATG T	Mommens et al. 1994
SPS115	15	100-130	AAAGTGACACAACAGCTTC TCCAG	AACGAGTGTCTAGTTTGG CTGTG	Moore & Byrne 1994
TGLA053	16	150-180	GCTTTCAGAAATAGTTTGC ATTCA	ATCTTCACATGATATTACA GCAGA	Kappes et al. 1997
TGLA122	21	120-145	CCCTCCTCCAGGTAAATCA GC	AATCACATGGCAAATAAGT ACATAC	Barendse et al. 1994
TGLA227	18	171-191	CGAATTCCAAATCTGTAA TTTGCT	ACAGACAGAACTCAATGA AAGCA	Kappes et al. 1997

Tabela III. Microsatélites analisados, número de alelos por marcador (NA), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) e valor de equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-valor) (*Microsatellites analyzed, number of alleles per marker (NA), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), polymorphic information content (PIC), inbreeding coefficient (F_{IS}) and Hardy-Weinberg equilibrium value (p-valor)*).

Microsatélite	NA	He	Ho	PIC	F_{IS}	p-valor
BM1314	12	0,808	0,743	0,778	0,081 (-0,035-0,179)	0,000***
BM1818	8	0,686	0,645	0,629	0,061 (-0,079-0,198)	0,703
BM1824	8	0,730	0,735	0,676	-0,008 (-0,169-0,144)	0,000***
BM2113	9	0,728	0,721	0,685	0,009 (-0,126-0,142)	0,794
CRSM60	7	0,652	0,693	0,610	-0,063 (-0,181-0,049)	0,923
CSSM66	9	0,659	0,556	0,630	0,158 (0,001-0,303)**	0,000***
ETH003	9	0,774	0,667	0,732	0,140 (0,004-0,255)**	0,030*
ETH010	7	0,673	0,718	0,611	-0,067 (-0,233-0,086)	0,007**
ETH185	12	0,804	0,614	0,771	0,237 (0,095-0,370)***	0,001**
ETH225	8	0,814	0,690	0,779	0,154 (0,002-0,291)**	0,013*
HAUT24	13	0,807	0,636	0,784	0,213 (0,050-0,364)***	0,000***
HAUT27	9	0,595	0,533	0,550	0,104 (-0,050-0,261)	0,229
HEL09	10	0,792	0,795	0,760	-0,003 (-0,106-0,101)	0,233
HEL13	6	0,654	0,594	0,607	0,091 (-0,048-0,228)	0,571
ILSTS006	6	0,667	0,568	0,620	0,150 (-0,017-0,316)	0,016*
ILSTS011	7	0,568	0,534	0,504	0,060 (-0,148-0,240)	0,148
INRA023	11	0,633	0,542	0,602	0,145 (-0,012-0,295)	0,002**
INRA032	9	0,781	0,813	0,744	-0,040 (-0,141-0,065)	0,278
INRA035	5	0,473	0,361	0,435	0,239 (0,014-0,453)***	0,005**
INRA037	9	0,821	0,787	0,789	0,042 (-0,066-0,153)	0,299
INRA063	6	0,650	0,677	0,584	-0,043 (-0,208-0,129)	0,378
MM12	10	0,760	0,636	0,715	0,164 (0,018-0,295)**	0,002**
SPS115	6	0,583	0,631	0,539	-0,082 (-0,222-0,046)	0,971
TGLA053	11	0,821	0,621	0,793	0,245 (0,096-0,375)***	0,000***
TGLA122	12	0,821	0,843	0,790	-0,027 (-0,135-0,077)	0,487
TGLA126	6	0,698	0,485	0,638	0,306 (0,144-0,457)***	0,000***
TGLA227	10	0,806	0,806	0,771	-0,001 (-0,117-0,112)	0,892
Média	8,70	0,713	0,653	0,671		

*p-valor < 0,05, **p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,001.

Tabela IV. Resultados, em porcentagem, de controles de filiação de 19 rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro do Brasil (*Results, in percentage, of controls of affiliation of 19 herds of Curraleiro Pé-Duro breed in Brazil*).

Código do rebanho	Compatível com ambos os pais	Compatível com pai	Compatível com mãe	Incompatível com pai e mãe propostos	Negativo para pai	Negativo para mãe	Negativo para pai ou mãe
C1	-	23,20	-	76,80	-	-	-
C2	-	33,33	-	66,67	-	-	-
C3	-	18,52	-	81,48	-	-	-
C4	2,63	50,00	-	47,37	-	-	-
C5	-	23,81	-	76,19	-	-	-
C6	-	23,08	-	76,92	-	-	-
C7	-	6,67	-	93,33	-	-	-
C8	-	9,09	-	90,91	-	-	-
C9	-	-	-	100	-	-	-
C10	-	12,5	-	87,5	-	-	-
C11	-	-	-	100	-	-	-
C12	-	44,44	-	55,56	-	-	-
C13	-	-	-	100	-	-	-
C14	-	-	-	100	-	-	-
C15	-	23,08	-	76,92	-	-	-
C16	-	48,61	2,08	49,31	-	-	-
C17	4,54	43,18	13,63	38,65	-	-	-
C18	-	4,25	-	95,75	-	-	-
C19	-	10,81	-	89,19	-	-	-

Tabela V. Proporção de lotes de animais para acasalamentos em dezenove rebanhos da raça Curraleiro Pé-Duro por quatro anos, código do rebanho (CR), número de lotes de fêmeas (LF), número médio de fêmeas/lote (NF/L), número de touros utilizados (NT), número de touros/machos descartados (TD), tempo de utilização do reprodutor no lote em anos (TUR), rodízio de touros em anos (RT), número de reprodutores adquiridos (NRA) (*Proportion of lots of animals for mating in nineteen herds of the Curraleiro Pé-Duro for four years, herd code (CR), number of lots of females (LF), average number of females/lot (NF/L), number of bulls used (NT), number of discarded bulls/males (TD), time of use of the breeder in the lot in years (TUR), rotation of bulls in years (RT), of breeding stock (NRA)*).

CR	LF	NF/L	NT	TD	TUR (anos)	RT (anos)	NRA
C1	6	25	6	49	2	2	0
C2	3	19	3	7	2	2	0
C3	3	18	3	2	2	2	0
C4	2	19	2	2	2	2	0
C5	2	17	2	8	2	2	0
C6	3	18	3	18	2	2	0
C7	2	18	2	9	2	2	0
C8	4	19	4	1	2	2	0
C9	2	20	2	0	2	2	0
C10	1	16	1	1	2	2	1
C11	1	15	1	0	2	2	0
C12	2	14	2	1	2	2	1
C13	2	18	2	0	2	2	0
C14	1	13	1	0	2	2	0
C15	1	13	1	2	2	2	1
C16	4	26	4	41	2	2	2
C17	2	18	2	12	2	2	0
C18	2	23	2	3	2	2	0
C19	2	19	2	1	2	2	0

CAPÍTULO 3 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE BOVINOS PANTANEIRO

☒ *Artículo/Article*

☐ *Nota corta/Short note*

☐ *Revisión/Revisión*

☐ *Carta al Editor/Letter to the Editor*

☐ *In Memoriam*

Área de genética y etonología/Area of genetics and ethnology.

Genetic diversity of Pantaneiro cattle

Bovinos em extinção.

Bovino local brasileiro.

Marcadores moleculares.

Programa de acasalamentos.

Seleção de reprodutores.

Cattle in extinction.

Brazilian local cattle.

Molecular markers.

Mating program.

Selection of breeders.

Resumo

O Pantaneiro é uma raça bovina local brasileira em risco de extinção, adaptada a região do Pantanal. Com este estudo objetivou-se avaliar a diversidade genética de rebanhos Pantaneiro para propostas de acasalamentos. Foram analisadas amostras de pelos de 290 animais, de quatro rebanhos distintos. Foram amplificados 27 microssatélites de DNA, mediante PCR. Foi calculado o número médio de alelos por loco, as frequências alélicas, as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) por meio do programa Microsatellite Toolkit. Os valores de coeficiente de consanguinidade foram calculados utilizando-se o programa GENETIX v. 4.05 e a prova de equilíbrio Hardy-Weinberg o GENEPOP v. 3.1c. Para cada animal analisado foi emitido um parecer do controle de filiação. Observou-se grande variabilidade alélica para o rebanho Pantaneiro, com número médio de alelos por loco de 6,80. Os valores médios de H_e e H_o foram 0,701 e 0,672, respectivamente. O valor médio de PIC foi 0,655. A probabilidade de exclusão combinada foi 0,99992. Os lotes de acasalamentos foram propostos na proporção macho:fêmea mínima de 1:13 à máxima de 1:21, dependendo do tamanho do rebanho. Os testes de paternidade possibilitaram a elaboração de programas de acasalamentos para os rebanhos, com vistas a melhorar a gestão genética destas populações.

Summary

The Pantaneiro is a Brazilian local bovine breed in danger of extinction, adapted to the Pantanal region. This study aimed to evaluate the genetic diversity of herds Pantaneiro for matings. Samples of hair bulb of 290 animals, from four different herds were analyzed. 27 DNA microsatellites were amplified by PCR. The average number of alleles per loci, allele frequencies, heterozygosities expected (He) and observed (Ho) and polymorphic information content (PIC) were calculated using the Microsatellite Toolkit program. The values for coefficient of inbreeding were calculated using the GENETIX v. 4.05 and the Hardy-Weinberg equilibrium test the GENEPOP v. 3.1c. For each animal analyzed an opinion of the control of affiliation was issued. Large allelic variability was observed for the Pantaneiro herd, with an average number of alleles per loci of 6,80. The average values of He and Ho were 0,701 and 0,672, respectively. The mean value of PIC was 0,655. The probability of combined exclusion was 0,99992. The mating lots were proposed at the minimum male:female ratio of 1:13 to the maximum of 1:21, depending on the size of the herd. The paternity tests enabled the elaboration of breeding programs for the herds, in order to improve the genetic management of these populations.

Introdução

O Pantaneiro é uma raça local em risco de extinção, adaptada ao bioma Pantanal, que é conhecido pelas variações climáticas que culminam com altas temperaturas no verão e com alagamentos por longos períodos durante o ano. Este bovino passou por anos de seleção natural, tornando-se muito resistente às condições adversas dessa região.

Quando comparado às raças exóticas especializadas, o bovino Pantaneiro é considerado menos produtivo, situação enfrentada pelas raças locais, sendo um dos motivos pelo baixo interesse para criação. No entanto, os rebanhos locais têm características regionais importantes que podem ser utilizadas nos programas de melhoramento genético (Primo et al. 1992).

Após a chegada dos zebuínos na região do Pantanal foram realizados cruzamentos absorventes entre os animais locais e os zebuínos, principalmente da raça Nelore, obtendo animais F1 de alta heterose, com o objetivo de melhorar a produtividade. Com isso, ocorreu uma acentuada perda de diversidade genética dos bovinos Pantaneiro (Serenio 2002, Rangel et al. 2004).

A perda da diversidade genética de rebanhos locais pode ser diminuída mantendo-se a variabilidade genética por meio de programas de conservação de recursos genéticos *in situ*, com a manutenção do animal em seu habitat natural e ainda *ex situ*, com a manutenção fora do ambiente natural, utilizando-se dessa forma de bancos de germoplasma, sendo executados por Institutos de Pesquisas e Universidades (Egito et al. 2002, Costa & Martins 2008).

Com o propósito de conservação *in situ* e *ex situ* destes recursos animais, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) desenvolveu o núcleo de criação *in situ* do bovino Pantaneiro na Fazenda Nhumirim e também conservação *ex situ* com a manutenção de bancos de germoplasma na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), sendo essas ações executadas pelo Programa Nacional de Conservação de Recursos Genéticos Animais (Egito 2007).

A caracterização genética de populações é fundamental para os programas de conservação de recursos genéticos animais, pois avalia a distância genética entre estas e auxilia na escolha dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*, por meio da

estimativa de índices de similaridade entre os indivíduos, possibilitando a indicação de acasalamentos que favorecerão a manutenção da variabilidade genética e evitando-se esforços na manutenção de amostras semelhantes (Egito, 2007).

Segundo Faria et al. (2010) vários programas de seleção e acasalamentos têm sido propostos para aperfeiçoar o uso da variabilidade genética em populações de animais domésticos, assegurando maiores taxas de respostas, minimizando os efeitos negativos da elevação da endogamia.

O sistema de acasalamento também deve ser considerado, já que influencia a variabilidade genética do rebanho, podendo aumentar a taxa de endogamia, que por sua vez, acontece devido ao acasalamento de indivíduos aparentados, aumentando-se a homozigose e diminuindo-se a heterozigose (Malhado et al. 2008, Queiroz et al. 2000).

Uma tecnologia que pode ser utilizada para identificação de indivíduos em uma população e determinação da probabilidade de parentesco entre dois indivíduos são os marcadores microssatélites de DNA (Araújo 2004), muito utilizados na genética de populações, por permitir a estimação dos níveis de variabilidade genética dentro das populações e analisar as relações genéticas entre elas, facilitando o estudo da diversidade genética entre animais domésticos ameaçados de extinção (Menezes 2005).

Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar a diversidade genética de rebanhos Pantaneiro para propostas de acasalamentos.

Material e métodos

A realização das provas genéticas de atribuição de parentesco e diversidade genética das populações de bovinos Pantaneiros contou com amostras de pelos de 290 animais, pertencentes a quatro rebanhos de propriedades rurais localizadas nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Tabela I). O sistema de criação utilizado nas propriedades era extensivo, sendo os animais criados à pasto com suplementação mineral *ad libitum*. Todos os animais foram identificados por brincos numerados e marcados.

As amostras de pelos foram coletadas em envelopes de papel e armazenadas em temperatura ambiente e, posteriormente enviadas para análises genéticas e moleculares no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da Universidade de Córdoba, Espanha. Para a extração de DNA das amostras de pelo utilizou-se o método Walsh (Walsh et al. 1991).

Foram amplificados 27 microssatélites de DNA, sendo estes recomendados pela FAO/ISAG para utilização em bovinos (Tabela II), mediante a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Os fragmentos obtidos mediante PCR foram submetidos a eletroforese em sequenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A tipificação alélica e análise dos fragmentos foram realizadas mediante os programas Genescan Analysis 3.1.2 e Genotyper 2.5.2 respectivamente, por meio do programa Genescan® 400HD ROX Size Standard. A probabilidade de exclusão por marcador (PE) e para o conjunto de marcadores (PEC) se calculou com o auxílio do programa informático CERVUS v.3.0 (Marshall et al. 1998).

Calculou-se o número médio de alelos por loco (NA), as frequências alélicas, as heterozigosidades esperada (He) e observada (Ho) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) por marcador mediante o programa Microsatellite Toolkit software para Excel (Park 2001).

Os valores de coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) com intervalo de confiança de 95% foram calculados utilizando-se o programa informático GENETIX v. 4.05 (Belkhir et al. 2003). A prova de equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW) foi realizada utilizando-se o programa GENEPOP v. 3.1c (Raymond & Rousset 1995), que aplica o teste exato de Fisher usando o método em cadeia de Monte Carlo Harkov (Guo & Thompson 1992).

Estas análises possibilitaram a realização de testes de paternidade, sendo efetuados controles de filiação por meio da comparação direta da fórmula genética do animal em estudo com as fórmulas dos pais propostos. Emitiu-se um parecer de filiação para cada indivíduo, podendo este ser compatível com ambos os pais, incompatível com ambos os pais, negativo para pai, negativo para mãe, negativo para pai ou mãe.

Após a análise dos testes de paternidade dos animais foram sugeridos acasalamentos para os rebanhos, indicando-se os possíveis touros e dividindo-se os rebanhos de fêmeas em lotes, evitando-se a utilização de reprodutores aparentados nos lotes de fêmeas. Para as sugestões de acasalamentos observou-se a distância genética entre os pares de indivíduos comparados, sendo que os touros que possuíam filhas no lote não poderiam ser utilizados neste e para aqueles que tinham grande quantidade de filhas no rebanho sugeriu-se a troca ou substituição por outro sem parentesco, com vistas a evitar os acasalamentos consanguíneos. As propostas de acasalamentos foram realizadas considerando-se também uma proporção macho:fêmea que poderia ser utilizada em qualquer sistema de acasalamentos, trabalhando-se com número de fêmeas compatível com o objetivo do programa, a conservação de recursos genéticos animais.

Resultados

Os resultados da análise dos 27 marcadores microssatélites de DNA utilizados no estudo de caracterização genética do bovino Pantaneiro estão apresentados na Tabela III. Os microssatélites utilizados apresentaram-se informativos e polimórficos, mostrando no mínimo 3 alelos para o microssatélite ETH003 e no máximo 11 alelos para o marcador TGLA122. Foi observada elevada variabilidade alélica no bovino Pantaneiro, onde o número médio de alelos apresentado foi 6,80.

Os valores de heterozigosidade esperada variaram entre 0,082 e 0,858. A heterozigosidade observada variou entre um mínimo de 0,028 e um máximo de 0,938 para o marcador TGLA122. Os valores médios de H_e e H_o foram 0,701 e 0,672, respectivamente. O valor médio de conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi 0,655, sendo os marcadores TGLA122 e HAUT24 os que apresentaram os maiores valores de PIC, 0,826 e 0,802, respectivamente.

Está demonstrado também na Tabela III, o valor de desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg (p-valor), indicando que somente 5 dos 27 marcadores se desviaram significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) mostrou que existem 3 microssatélites que detectaram um excesso significativo de homozigotos na população (ETH185, HAUT27 e TGLA053). O microssatélite SPS115 detectou um excesso significativo de heterozigotos na população. O bovino Pantaneiro apresentou elevada diversidade genética intra-racial.

O controle de filiação realizado com a utilização de marcadores microssatélites de DNA demonstrou probabilidade de exclusão combinada (PEC) de 0,99992 quando os dois progenitores eram conhecidos. Todas as amostras foram genotipadas com o painel de microssatélites de DNA e suas fórmulas genéticas ficaram depositadas no Laboratório de Genética Molecular Aplicada de Córdoba para futuras provas de identificação individual e controle de filiação em um banco de dados.

O controle de filiação dos rebanhos analisados está apresentado na Tabela IV. As possibilidades de resultados estão descritas a seguir: 1. compatível com ambos os pais indicou que o indivíduo avaliado foi compatível com o pai e a mãe propostos, sendo que o genótipo do indivíduo é fruto da combinação dos alelos presentes nos genótipos de ambos os progenitores; 2. incompatível com pai e mãe, sendo o indivíduo incompatível com a mãe e com o pai propostos, o genótipo do indivíduo não têm possibilidade de ter surgido da combinação alélica dos genótipos dos progenitores; 3. negativo para pai, o indivíduo é compatível com a mãe proposta, mas é incompatível com o pai proposto, sendo que o pai não compartilha nenhum alelo com o indivíduo; 4. negativo para mãe, o indivíduo é compatível com o pai proposto, mas é incompatível com a mãe proposta e 5. negativo para pai ou mãe, onde um dos progenitores propostos é incompatível com o indivíduo, mas não se pode determinar qual deles é o incompatível, neste caso um dos alelos do genótipo do indivíduo está presente em ambos os progenitores, mas o outro não está em nenhum deles, sendo assim, não se pode saber qual deles trazem este alelo.

Conforme a Tabela IV, os rebanhos C1, C2, C3 e C4 apresentaram compatibilidade genética com os propostos pais de 18,29%, 17,24%, 42,10% e 33,33%, respectivamente. Demonstraram compatibilidade com as mães propostas os rebanhos C2 com 2,30%, C3 com 7,89% e C4 com 13,33%, enquanto o C1 não demonstrou compatibilidade com nenhuma mãe proposta. Os rebanhos C3 e C4 demonstraram 21,05% e 46,67%, respectivamente, de compatibilidade com ambos os pais propostos, sendo identificadas as famílias destes animais no rebanho. Já os resultados de incompatibilidade para ambos os pais propostos nos rebanhos C1, C2, C3 e C4 foram 81,71%, 80,46%, 28,96%, 6,67%, respectivamente, sendo o rebanho C4 o que apresentou a maior quantidade de dados genealógicos conhecidos.

Foram sugeridos acasalamentos para os rebanhos da raça Pantaneiro (Tabela V), onde se considerou o número de fêmeas em fase reprodutiva nos rebanhos, o número de touros das propriedades e principalmente os resultados de paternidade. Os touros com grande número de filhas no rebanho e aqueles que não seriam necessários, em razão do número de machos em algumas propriedades ser superior ao número de lotes de fêmeas, não participaram das sugestões de acasalamentos para os rebanhos, recomendando-se a substituição destes por meio de trocas, descarte ou aquisição de outros touros oriundos de rebanhos diferentes, evitando-se a utilização de touros aparentados nos lotes de fêmeas.

Para as sugestões de acasalamentos observou-se a distância genética entre os pares de indivíduos comparados nos testes de paternidade, para controlar a endogamia dos rebanhos em estudo. As propostas de acasalamentos foram realizadas considerando-se também uma proporção macho:fêmea que poderia ser utilizada em qualquer sistema de acasalamentos escolhido pelos criadores, trabalhando-se com número de fêmeas compatível com o objetivo do programa, a conservação de recursos genéticos animais. Os lotes para acasalamentos foram montados na proporção macho:fêmea mínima de 1:13 à máxima de 1:21, dependendo do tamanho do rebanho.

Discussão

O rebanho Pantaneiro apresentou número médio de 6,80 alelos por loco, enquanto Tambasco et al. (2000) encontraram 4,83 alelos ao analisar 180 animais da raça Nelore utilizando-se seis marcadores microssatélites e Carneiro et al. (2007) 8,20 alelos por loco, em trabalho que avaliou onze marcadores microssatélites de DNA nesta raça. Já Rodrigues et al. (2002) encontraram 7 alelos por loco avaliando-se a raça Gir. Comparando-se estes dados, observou-se que os bovinos Pantaneiros demonstraram que possuem grande variabilidade genética, apresentando número médio de alelos por loco semelhante aos resultados

encontrados em raças com grande número de indivíduos no Brasil. Entretanto, é importante que se realize uma correta gestão destes recursos animais, pois entre as raças locais brasileiras o Pantaneiro é o que apresenta maior risco de extinção, de acordo com Albuquerque & Lanella (2016), uma vez que se estima que o rebanho nacional seja de 500 cabeças.

A média de alelos por loco verificada nos rebanhos Pantaneiro comprovou que apesar do pequeno número de animais, a população efetiva contribuiu para manter a variabilidade genética intra-racial. O Relatório Nacional sobre a Situação dos Recursos Genéticos Animais em Portugal destacou a importância da manutenção da variabilidade genética intra-racial, enfatizando que a consanguinidade aumentou em diversas raças autóctones daquele país e está se tornando preocupante, de acordo com Gama et al. (2004) que considera este fato resultante do reduzido efetivo de animais e também de não ter sido dada atenção merecida a esta problemática. Com isso, fica evidente a necessidade da conservação de recursos genéticos animais de populações reduzidas como o Pantaneiro, em razão do risco de aumento da endogamia ser constante.

Em relação aos valores médios de H_e (0,701) e H_o (0,672), estes se mantiveram conforme os valores esperados para os locos, acima de 0,5, indicando alta variabilidade genética para o Pantaneiro. Carneiro et al. (2007) encontraram o valor médio de 0,42 de H_o para a raça Nelore, sendo este um valor baixo quando comparado com outras raças, sendo que o marcador que apresentou o valor máximo de H_o em seu estudo foi o TGLA122 (0,92), concordando neste dado com este estudo, já que o marcador microssatélite que apresentou a maior H_o no Pantaneiro foi o TGLA122 (0,938). Radko et al. (2005) observaram valores de H_o entre 0,60 e 0,75 ao utilizarem raças autóctones em extinção, concordando também com os valores médios encontrados neste estudo.

Considerando que a heterozigosidade quantifica os heterozigotos nos locos marcadores, verificou-se que os valores médios de H_e e H_o encontrados para o Pantaneiro indicaram a diversidade genética existente na população.

O valor médio de PIC foi 0,655 e os marcadores TGLA122 e HAUT24 destacaram-se em relação aos maiores valores de PIC, sendo 0,826 e 0,802, respectivamente. No entanto, os marcadores ETH003, INRA035 e SPS115 apresentaram valores de PIC inferiores à 0,5, sendo eles 0,079, 0,387 e 0,492, respectivamente. Nguyen et al. (2005) em seu estudo com 51 iaques suíços também encontraram valores baixos de PIC para o marcador ETH003, semelhante ao resultado aqui encontrado. Os marcadores INRA035 e SPS115 que apresentaram valores de PIC entre 0,25 e 0,50 são considerados medianamente informativos, de acordo com Botstein et al (1980). O ETH003 é pouco informativo por apresentar valor de PIC inferior a 0,25, demonstrando também este resultado em outros estudos, podendo-se inferir que este marcador não demonstrou resultados satisfatórios para este tipo de estudo.

Considerando-se o valor médio do PIC para todos os marcadores, estes foram considerados muito informativos, se tratando de detecção da variabilidade genética no bovino Pantaneiro.

Cinco marcadores microssatélites se desviaram significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg (BM1818, ETH003, HAUT27, INRA032, TGLA053). Estes desvios do EHW podem ser originados de acasalamentos direcionados, subdivisões dentro das populações, coancestrais e antepassados comuns, seleção natural, migração ou fluxo de genes. De acordo com Menezes et al. (2006) qualquer desvio significativo do EHW indica que a população está subdividida, existindo endogamia significativa ou fluxo de genes de outra população, justificando este desequilíbrio em alguns locos marcadores, pois o Pantaneiro representa uma população com pequeno número de animais.

O F_{IS} mostrou três microssatélites que detectaram excesso significativo de homozigotos na população (ETH185, HAUT27 e TGLA053). O coeficiente de consanguinidade indica a probabilidade de dois alelos de um mesmo loco serem idênticos por descendência, sendo assim, estes resultados demonstraram endogamia no rebanho. Em contrapartida, um marcador (SPS115) detectou excesso significativo de heterozigotos na população e os valores negativos e próximos a zero apresentados pela maioria dos microssatélites analisados indicam segundo Barros et al. (2011) que o rebanho tem alta variabilidade genética, principalmente porque tais valores indicam grande quantidade de heterozigotos na população.

Analisando-se o F_{IS} , o número de alelos por loco, a H_e , a H_o e o EHW observou-se que apesar de alguns marcadores terem apresentado excesso de homozigotos, em rebanhos com acasalamentos não direcionados e pequeno número de animais como o Pantaneiro, podendo ainda ter efeito da migração e deriva genética, pode-se inferir que a endogamia apresentada ficou dentro de parâmetros já esperados, comprovando a variabilidade genética presente nos rebanhos e que os marcadores microssatélites utilizados demonstraram eficiência na detecção de variações genéticas.

Os resultados apresentados neste estudo evidenciaram a importância da caracterização genética de populações para o estudo da variabilidade genética, principalmente quando se trata de rebanhos de conservação. Machugh et al. (1994) relataram a importância das pesquisas em rebanhos que se encontram em situação de risco, ficando evidente a preocupação que se tem há anos com os rebanhos em extinção, que estão desaparecendo sem ao menos ter sido identificado seu potencial e genética.

Outro fator positivo deste estudo foi a inclusão dos dados genealógicos de 290 animais Pantaneiros no banco de dados do Laboratório de Genética Molecular Aplicada, podendo facilitar os próximos estudos envolvendo esta e outras populações, auxiliando indiretamente na gestão e conservação deste rebanho no Brasil.

Os valores encontrados para PEC neste estudo (0,99992) indicaram que os testes de paternidade foram confiáveis na comparação genética dos indivíduos propostos, corroborando com Marshall et al. (1998), que destacaram que valores de PEC superiores a 0,999 para todos os locos são considerados satisfatórios.

A partir dos resultados dos testes de paternidade dos animais Pantaneiros iniciou-se o agrupamento destes animais em famílias, onde foram sugeridos programas de acasalamentos para os quatro rebanhos, considerando a quantidade de filhas dos atuais touros do rebanho, a formação de lotes, o rodízio de touros, o descarte de touros ou machos que não estavam sendo utilizados no rebanho para que estes pudessem ser utilizados em outros rebanhos desta raça, mantendo o foco na diminuição da endogamia e evitando-se assim os acasalamentos entre animais aparentados.

Verificou-se que na maioria dos rebanhos estudados não são realizados manejos frequentes dos bovinos, sendo criados soltos, longe das sedes das fazendas e em pastos nativos. Sendo assim, foi proposto que o sistema de acasalamentos dos rebanhos Pantaneiro fosse escolhido pelos criadores, por conhecerem a realidade de suas propriedades, o acesso às tecnologias, a disponibilidade de infraestrutura e mão-de-obra, dentre outros.

O rodízio de touros proposto para os rebanhos deve ser considerado em função do tempo de utilização dos reprodutores nos rebanhos, da formação dos lotes, da disponibilidade de touros dissimilares geneticamente das fêmeas, respeitando-se as designações das paternidades, para que as novilhas que entrarão para o programa de acasalamentos posteriormente, não sejam acasaladas com seus pais ou parentes, devendo-se formar outros lotes com outros

touros, aumentando a diversificação de reprodutores e matrizes, principalmente se for adotado o método de inseminação artificial.

A variabilidade genética constatada no Pantaneiro precisa ser otimizada nos acasalamentos de populações pequenas, buscando-se conservar estes recursos genéticos animais que possuem características relevantes como adaptação, rusticidade e resistência a endo e ectoparasitas. Para Cunha et al. (2003) os principais efeitos da consanguinidade estão ligados à adaptação e reprodução, podendo esta inviabilizar o sistema de produção e causar a extinção, devendo ser evitada.

Este estudo representa um primeiro passo para se aumentar o número de animais da raça, utilizando-se para isso animais que apresentam variabilidade genética, para que este recurso genético brasileiro seja conservado e em um futuro próximo possa ser melhorado para que mais produtores tenham interesse na criação.

Conclusão

Os bovinos Pantaneiro apresentam grande variabilidade genética intra-racial. Apesar de ser a raça local com o maior risco de extinção no Brasil, os rebanhos apresentaram elevada diversidade genética para acasalamentos.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Fapeg) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), pelos recursos financeiros concedidos.

Bibliografia

- Albuquerque, MSM, Lanella, P 2016, *Inventário de recursos genéticos animais da Embrapa*, Emprapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 108 pp.
- Araújo, AM 2004, *Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA*, 104f, Tese, Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.
- Barendse, W et al. 1994, A genetic linkage map of bovine genome, *Nature genetics*, vol. 6, pp. 227-35.
- Barros, EA, Ribeiro, MN, Almeida, MJO, Araújo, AM 2011, Estrutura populacional e variabilidade genética da raça caprina Marota, *Archivos de Zootecnia*, vol. 60, no. 231, pp. 543-52.
- Belkhir, K, Borsa, P, Chikhi, L, Raufaste, N, Bonhomme, F 2003, *Genetix: 4.05 Logiciel sous WindowsTM pour la genetique des populations*, Montpellier: U.d. Montpellier, France.
- Bishop, M & Kappes, S 1994, A genetic linkage map for cattle, *Genetics*, vol. 136, pp. 619-39.
- Botstein, D, White, R, Skolnick, H, Davis, R 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *American Journal of Human Genetics*, vol. 32, pp. 314-31.
- Brezinsky, L, Kemp, J & Teale, A 1993, ILSTS006: a polymorphic bovine microsatellite, *Anim. Genet.*, vol. 24, pp. 7.

- Carneiro, T, Gonçalves, E, Schneider, M, Silva, A 2007, Diversidade genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol. 59, no. 5, pp. 1257-62.
- Costa, PM, Martins, CF 2008, Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução, *Universitas Ciências da Saúde*, vol. 6, no. 1, pp. 39-55.
- Cunha, E, Euclides, R, Torres, R, Lopes, P, Júnior, J, Carneiro, P 2003, Efeito de tipos de acasalamentos e razões sexuais na seleção baseada no BLUP, *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 32, no. 6, pp. 1297-303.
- Egito, AA 2007, *Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação*, 246f, Tese, Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- Egito, AA, Mariante, AS, Albuquerque, MSM 2002, Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais, *Archivos de Zootecnia*, vol. 51, no. 50, pp. 39-52.
- Faria, LC, Queiros, AS, Vozzi, PA, Lobo, RB, Magnabosco, CU, Oliveira, JA 2010, Variabilidade genética da raça Brahman no Brasil detectada por meio de análise de pedigree, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 45, no. 10, pp. 1133-40.
- Gama, LT, Carolino, N, Costa, MS & Matos, CP 2004, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Estação Zootécnica Nacional, Recursos genéticos animais em Portugal: relatório nacional, Portugal, 68pp.
- Guo, S & Thompson, E 1992, Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles, *Biometrics*, vol. 48, pp. 361-72.
- Kappes, S, Keele, R, Stone, R & McGraw, T 1997, A second-generation linkage map of the bovine genome, *Genome Research*, vol. 7, pp. 235-49.
- Kaukinen, J & Varvio, S 1993, Eight polymorphic bovine microsatellites, *Animal Genetics*, vol. 24, pp. 148.
- Machugh, DE, Loftus, RT, Bradley, DG 1994, Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds, *Proc. R. Soc. Lond. B.*, vol. 256, pp. 25-31.
- Malhado, CHM, Carneiro, PLS, Pereira, DG, Martins Filho, R 2008, Progresso genético e estrutura populacional do rebanho nelore do Estado da Bahia, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 43, no. 9, pp. 1163-69.
- Marshall, T, Slate, J, Kruuk, L, Pemberton, J 1998, Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations, *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, pp. 639-55.
- Menezes, MPC 2005, *Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias*, 110f, Tese, Doutorado em Produção Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará.
- Menezes, MPC, Martinez, AM, Ribeiro, MN, Pimenta Filho, EC, Bermejo, JVD 2006, Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites, *Rev. Bras. Zootec.*, vol. 35, no. 4, pp.1336-41.
- Mommens, G, Coppieters, A, Van de Weghe, A & Van Zeveren, Y 1994, Dinucleotide repeat polymorphism at the bovine MM12E6 and MM8D3 loci, *Animal Genetics*, vol. 25, pp. 368.
- Moore, S & Byrne, K 1994, Characterization of 65 bovine microsatellites, Mamm, *Genome*, vol. 5, pp. 84-90.
- Nguyen, TT, Genini, S, Menetrey, F, Malek, M, Vogeli, P, Goe, MR, Stranzinger, G 2005, Application of bovine microssatélite markers for genetic diversity analysis of swiss yak (*Poephagus grunniens*), *Animal Genetics*, vol. 36, pp.484-89.
- Park, S 2001, *Trypanotolerance in West African Cattle and the population genetic effects of selection* University of Dublin, Dublin.

- Primo, AT 1992, El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después, *Arch. Zootec.*, vol. 41, no. 154, pp.421-32.
- Queiroz, AS, Albuquerque, LG, Lanzoni, NA 2000, Efeito da endogamia sobre características de crescimento de bovinos da raça Gir no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 29, no. 4, pp. 1014-19.
- Radko, A, Zyga, A, Zabek, T et al. 2005, Genetic variability among Polish Red, Hereford and Holstein-Friesian cattle raised in Poland based on analysis of microsatellite DNA sequences, *J. Appl. Genet.*, vol. 46, pp.89-91.
- Rangel, PN, Zucchi, MI, Ferreira, ME 2004, Similaridade genética entre raças bovinas brasileiras, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, vol. 39, no.1, pp. 97-100.
- Raymond, M & Rousset, F 1995, Genepop version 1.2, Population genetics software for exact test and ecumenicism, *Journal of Heredity*, vol. 86, no. 3, pp. 248-9.
- Rodrigues, S, Oliveira, D, Teixeira, C et al. 2002, Microssatélites BM2113, ILSTS005, ILSTS008, ETH131 e RM88 em testes de verificação de parentesco para bovinos da raça Gir, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol. 54, pp. 309-13.
- Sereno, JRB 2002, *Uso potencial do bovino pantaneiro na produção de carne orgânica do pantanal*, I Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/congressovirtual/pdf/portugues/06pt04.pdf>. Acesso em: 08 mai 2015.
- Solinas Toldo, S & Fries, R 1993, Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes, *Mamm. Genome*, vol. 4, pp. 720-27.
- Steffen, P & Eggen, A 1993, Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle, *Anim. Genet.*, vol. 24, pp. 121-24.
- Tambasco, DD, Alencar, MM, Coutinho, LL, Tambasco, AJ, Tambasco, MD, Regitano, A 2000, Caracterização molecular de animais da raça nelore utilizando microssatélites e genes candidatos, *Rev. Bras. Zootec.*, vol. 29, no. 4, pp. 1044-49.
- Thieven, U, Solinas-Toldo, R, Friedl, J & Masabanda, R 1997, Polymorphic CA-microsatellites for the integration of the bovine genetic and physical map, *Mammalian Genome*, vol. 8, pp. 52-55.
- Vaiman, D et al. 1994, A set of 99 cattle microsatellites: characterization, syntenic mapping, and polymorphism, *Mammalian Genome*, vol. 5, no. 5, pp. 288-97.
- Walsh, P, Metzger, D & Higuchi, R 1991, Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Biotechniques*, vol. 10, pp. 506-13.

Tabela I. Identificação dos criatórios, número de amostras de DNA para os testes de paternidade, sexo dos animais (Fêmea/Macho-bezerros), número de touros supostos pais, código do grupo e total de animais da raça Pantaneiro (*Identification of breeders, number of DNA samples for paternity tests, gender of animals (Female/Male-calves), number of bulls presumed to be fathers, group code and total number of Pantaneiro*).

Identificação da Fazenda	Localização	Nº de amostras	Sexo (F/M)	Nº de touros supostos pais	Código do grupo
Promissão	Poconé - MT	85	82F	3	C1
Nhumirim	Corumbá - MS	101	70F / 17M	14	C2
Santo Augusto	Rochedo - MS	65	40F / 11M	14	C3
UEMS	Aquidauana - MS	39	25F	14	C4
TOTAL		290			

Tabela II. Microsatélites analisados (STR), cromossomos (crom.), tamanhos em pares de bases (pb), sequências de *primers* diretos e reversos e referências bibliográficas (*Microsatellites analyzed (STR), chromosomes (crom), base pair sizes (pb), direct and reverse primers sequences and bibliographic references*).

STR	Crom.	Tamanho (pb)	“primers” Direto e Reverso		Referência
BM1314	26	173-203	TTCTCTCTCTCTCTCCAAA C	ATCTCAAACGCCAGTGTGG	Bishop & Kappes 1994
BM1818	23	90-110	AGCTGGGAATATAACCAAA GG	AGTGCTTTCAAGGTCCATG C	Bishop & Kappes 1994
BM1824	1	134-165	GAGCAAGGTGTTTTTCCAA TC	CATTCTCCAAGTCTTCCTT G	Bishop & Kappes 1994
BM2113	2	104-130	GCTGCCTTCTACCAAATAC CC	CTTCCTGAGAGAAGCAACA CC	Bishop & Kappes 1994
BM8125	17	128-157	CTCTATCTGTGGAAAAGGT GGG	GGGGGTTAGACTTCAACAT ACG	Bishop & Kappes 1994
CSRM60	10	180-200	AAGATGTGATCCAAGAGAG AGGCA	AGGACCAGATCGTGAAAGG CATAG	Moore & Byrne 1994
CSSM66	14	282-315	ACACAAATCCTTTCTGCCA GCTGA	AATTTAATGCACTGAGGAG CTTGG	Barendse et al. 1994
ETH003	19	254-290	GAACCTGCCTCTCCTGCATT GG	ACTCTGCCTGTGGCCAAGT AGG	Solinas Toldo & Fries 1993
ETH010	5	160-195	GTTTCAGGACTGGCCCTGCT AACA	CCTCCAGCCCACCTTTCTCTT CTC	Solinas Toldo & Fries 1993
ETH185	17	105-145	TGCATGGACAGAGCAGCCT GGC	GCACCCCAACGAAAGCTCC CAG	Steffen & Eggen 1993
ETH225	9	240-260	GATCACCTTGCCACTATTTCT CT	ACATGACAGCCAGCTGCTA CT	Steffen & Eggen 1993
HAUT24	22	120-146	CTCTCTGCCTTTGTCCCTGT	AATACACTTTAGGAGAAAA ATA	Thieven et al. 1997
HAUT27	27	203-232	TTTTATGTTTATTTTTTGAC TGG	AACTGCTGAAATCTCCATC TTA	Thieven et al. 1997
HEL09	8	102-136	CCCATTCAGTCTTCAGAGG T	CACATCCATGTTCTCACCAC	Kaukinen & Varvio, 1993
HEL13	11	215-240	TAAGGACTTGAGATAAGGA G	CCATCTACCTCCATCTTAAC	Kaukinen & Varvio, 1993
ILSTS006	7	141-182	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG	ACACGGAAGCGATCTAAAC G	Brezinsky et al. 1993
ILSTS011	14	150-170	GCTTGCTACATGGAAAGTG C	CTAAAATGCAGAGCCCTAC C	Brezinsky et al. 1993
INRA023	3	75-107	GAGTAGAGCTACAAGATAA ACTTC	TAACTACAGGGTGTTAGAT GAACTC	Vaiman et al. 1994
INRA032	11	100-122	AAACTGTATTCTCTAATAG CTAC	GCAAGACATATCTCCATTC CTTT	Vaiman et al. 1994
INRA035	16	153-173	ATCCTTTGCAGCCTCCACAT TG	TTGTGCTTTATGACACTATC CG	Vaiman et al. 1994
INRA037	10	180-200	GATCCTGCTTATATTTAACC AC	AAAATTCCATGGAGAGAGA AAC	Vaiman et al. 1994
INRA063	18	265-285	ATTTGCACAAGCTAAATCT AACC	AAACCACAGAAATGCTTGG AAG	Vaiman et al. 1994
MM12	9	190-225	CAAGACAGGTGTTTCAATC T	ATCGACTCTGGGGATGATG T	Mommens et al. 1994
SPS115	15	100-130	AAAGTGACACAACAGCTTC TCCAG	AACGAGTGTCTAGTTTGG CTGTG	Moore & Byrne 1994
TGLA053	16	150-180	GCTTTCAGAAATAGTTTGC ATTCA	ATCTTCACATGATATTACA GCAGA	Kappes et al. 1997
TGLA122	21	120-145	CCCTCCTCCAGGTAAATCA GC	AATCACATGGCAAATAAGT ACATAC	Barendse et al. 1994
TGLA227	18	171-191	CGAATTCCAAATCTGTAA TTTGCT	ACAGACAGAACTCAATGA AAGCA	Kappes et al. 1997

Tabela III. Microssatélites analisados, número de alelos por marcador (NA), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), coeficiente de consanguinidade (F_{IS}) e valor de equilíbrio de Hardy-Weinberg (p-valor) (*Microsatellites analyzed, number of alleles per marker (NA), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), polymorphic information content (PIC), inbreeding coefficient (F_{IS}) and Hardy-Weinberg equilibrium value (p-valor)*).

Microssatélite	NA	He	Ho	PIC	F_{IS}	p-valor
BM1314	7	0,802	0,829	0,759	-0,034 (-0,194-0,115)	0,111
BM1818	5	0,703	0,639	0,635	0,092 (-0,133-0,289)	0,025*
BM1824	4	0,693	0,722	0,629	-0,043 (-0,233-0,137)	0,870
BM2113	9	0,775	0,811	0,736	-0,047 (-0,197-0,077)	0,222
CRSM60	8	0,817	0,892	0,782	-0,092 (-0,209-0,014)	0,464
CSSM66	6	0,734	0,714	0,678	0,027 (-0,183-0,204)	0,289
ETH003	3	0,082	0,028	0,079	0,663 (-0,029-1,000)	0,016*
ETH010	6	0,755	0,757	0,705	-0,002 (-0,183-0,140)	0,378
ETH185	6	0,688	0,486	0,620	0,295 (0,052-0,515)***	0,067
ETH225	8	0,691	0,667	0,637	0,036 (-0,143-0,206)	0,931
HAUT24	7	0,850	0,706	0,802	0,174 (-0,121-0,412)	0,158
HAUT27	5	0,673	0,486	0,630	0,280 (0,037-0,472)***	0,003*
HEL09	8	0,798	0,730	0,757	0,086 (-0,106-0,252)	0,342
HEL13	6	0,769	0,838	0,717	-0,091 (-0,239-0,051)	0,663
ILSTS006	4	0,672	0,656	0,613	0,024 (-0,244-0,234)	0,425
ILSTS011	5	0,630	0,694	0,558	-0,104 (-0,337-0,126)	0,226
INRA023	10	0,746	0,686	0,715	0,082 (-0,100-0,258)	0,658
INRA032	8	0,793	0,645	0,752	0,189 (-0,022-0,377)	0,025*
INRA035	6	0,420	0,417	0,387	0,008 (-0,197-0,244)	0,812
INRA037	7	0,748	0,714	0,704	0,045 (-0,128-0,204)	0,418
INRA063	4	0,660	0,600	0,592	0,092 (-0,120-0,304)	0,627
MM12	8	0,757	0,784	0,723	-0,036 (-0,176-0,089)	0,773
SPS115	7	0,527	0,600	0,492	-0,141 (-0,291-0,027)**	0,669
TGLA053	9	0,839	0,577	0,800	0,317 (0,080-0,544)***	0,006*
TGLA122	11	0,858	0,938	0,826	-0,094 (-0,205-0,002)	0,855
TGLA126	8	0,702	0,806	0,651	-0,150 (-0,314-0,009)	0,759
TGLA227	8	0,739	0,722	0,697	0,024 (-0,163-0,180)	0,133
Media	6,80	0,701	0,672	0,655		

*p-valor < 0,05, **p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,001.

Tabela IV. Resultados, em porcentagem, de controles de filiação de quatro rebanhos da raça Pantaneiro do Brasil (*Results, in percentage, of controls of affiliation of four herds of Pantaneiro breed in Brazil*).

Código do rebanho	Compatível com ambos os pais	Compatível com pai	Compatível com mãe	Incompatível com pai e mãe propostos	Negativo para pai	Negativo para mãe	Negativo para pai ou mãe
C1	-	18,29	-	81,71	-	-	-
C2	-	17,24	2,30	80,46	-	-	-
C3	21,05	42,10	7,89	28,96	-	-	-
C4	46,67	33,33	13,33	6,67	-	-	-

Tabela V. Proporção de lotes de animais para acasalamentos em quatro rebanhos da raça Pantaneiro por quatro anos, código do rebanho (CR), número de lotes de fêmeas (LF), número médio de fêmeas/lot (NF/L), número de touros utilizados (NT), número de touros/machos descartados (TD), tempo de utilização do reprodutor no lote em anos (TUR), rodízio de touros em anos (RT), número de reprodutores adquiridos (NRA) (*Proportion of lots of animals for mating in four herds of the Pantaneiro for four years, herd code (CR), number of lots of females (LF), average number of females/lot (NF/L), number of bulls used (NT), number of discarded bulls/males (TD), time of use of the breeder in the lot in years (TUR), rotation of bulls in years, of breeding stock (NRA)*).

CR	LF	NF/L	NT	TD	TUR (anos)	RT (anos)	NRA
C1	4	21	4	1	2	2	2
C2	4	18	4	27	2	2	0
C3	2	20	2	23	2	2	0
C4	2	13	2	12	2	2	0

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os rebanhos de raças locais brasileiras, especialmente os envolvidos neste estudo, Pantaneiro e Curraleiro Pé-Duro, tem baixa expressão no cenário produtivo e isso pode ser um dos motivos que justificam a escassez de materiais que caracterizem estas populações, que por sua vez, se encontram em risco de extinção.

A realização de testes de paternidade se faz importante para o acompanhamento da evolução dos rebanhos, orientando a seleção e utilização de reprodutores, auxiliando programas de conservação *in situ* e *ex situ*. Os programas de acasalamentos propostos servem como base para o monitoramento dos rebanhos e ampliação destas populações, buscando-se o uso e valoração destes patrimônios genéticos.

Desta forma, buscou-se identificar as famílias existentes nos diferentes rebanhos, sendo por isso realizado testes de paternidade de 1073 animais da raça Curraleiro Pé-Duro e de 290 animais Pantaneiro, números representativos dentro destas populações. Apesar de se tratar de rebanhos fechados e com pequeno número de animais, as duas raças apresentaram ter muita diversidade genética intra-racial, sendo que essa característica precisa ser explorada.