

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES DO CROMOSSOMO 6 EM RAÇAS
BUBALINAS COMERCIAIS DO BRASIL**

Jacqueline de Andréa Dernowsek Meirelles

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Agosto - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES DO CROMOSSOMO 6 EM RAÇAS
BUBALINAS COMERCIAIS DO BRASIL**

Jacqueline de Andréa Dernowsek Meirelles

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Elisabete Jorge Amaral

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Agosto – 2011

M514a Meirelles, Jacqueline de Andréa Dernowsek
Análise de polimorfismo de marcadores microssatélites do cromossomo
6 em raças bubalinas comerciais do Brasil / Jacqueline de Andréa
Dernowsek Meirelles. -- Jaboticabal, 2011
ix, 64 f.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientadora: Maria Elisabete Jorge Amaral

Banca examinadora: Sandra Aidar de Queiroz, Beatriz da Costa
Aguiar Alves Reis

Bibliografia

1. BBU6. 2. DNA. 3. Variabilidade genética.I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575:636.293.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DO CROMOSSOMO 6 EM RAÇAS BUBALINAS COMERCIAIS DO BRASIL

AUTORA: JACQUELINE DE ANDRÉA DERNOWSEK MEIRELLES

ORIENTADORA: Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA ELISABETE JORGE AMARAL

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE FERNANDO GARCIA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. SANDRA AIDAR DE QUEIROZ

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. BEATRIZ DA COSTA AGUIAR ALVES REIS

Centro de Pesquisas Em Biotecnologia / Universidade de Sao Paulo

Data da realização: 05 de agosto de 2011.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JACQUELINE DE ANDRÉA DERNOWSEK MEIRELLES – nascida em 24 de setembro de 1982, na cidade de Ribeirão Preto - SP, Brasil, filha de José Ambrósio Dernowsek e Clarice de Andréa Dernowsek. Iniciou em fevereiro de 2004 o curso de Ciências Biológicas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV – UNESP), onde em dezembro de 2007 obteve o título de Licenciatura em Ciências Biológicas. Em 2008, foi bolsista de treinamento técnico da FAPESP, no projeto intitulado: Inovações incrementais no processo de seleção do sexo de espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade. Em março de 2009 ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, (FCAV – UNESP) como aluna de mestrado, bolsista da CAPES, orientada pela Prof^a. Dr^a. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima.

Aos meus queridos pais **José Ambrósio
Dernowsek e Clarice de Andréa Dernowsek**,
meus exemplos de amor, humildade e princípios,
que sempre apoiaram, incentivaram e financiaram
meus estudos e meus sonhos. Obrigada por tudo.

DEDICO !

Ao meu marido **Joaquim**, por todo apoio, paciência, carinho e amor dedicados em todos esses anos. Por estar ao meu lado sempre me incentivando a continuar, principalmente nos momentos difíceis. Você deixou minha vida mais leve e muito feliz. Te amo!

OFEREÇO !

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar todos os dias e me dar forças suficientes para caminhar, mesmo quando isso parecia impossível.

À Prof^a. Dr^a. Vera F. M. Hossepian de Lima, pela orientação e confiança depositados em mim no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pela oportunidade, pelas experiências e, acima de tudo, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais compartilhados nesses anos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Elisabete Jorge Amaral, pela co-orientação e ensinamentos, por ter me recebido em seu laboratório em Rio Preto e por ter cedido os materiais necessários para a realização desse trabalho e pela amizade conquistada nos momentos em que fiquei hospedada em Rio Preto.

Às professoras Dr^a. Janete Aparecida Desidério e Dr^a. Sandra Aidar de Queiroz, pela grande contribuição dada a este trabalho no exame de qualificação.

Aos membros da comissão examinadora da presente dissertação de mestrado Dr^a. Beatriz da Costa Aguiar Alves Reis e Dr^a. Sandra Aidar de Queiroz pela contribuição de seus conhecimentos para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto Tonhati, pela ajuda na coleta das amostras dos animais, entrando em contato com os proprietários das fazendas de búfalos. Também agradeço aos proprietários pelo consentimento de coleta das amostras de pelos, a Daniele e ao André pelo apoio no campo, coletando as amostras nas Fazendas de Ribeirão Preto e Sales Oliveira.

À Prof^a. Dr^a. Ana Lilia Alzate Marin (USP – Ribeirão Preto), por ter me recebido em seu laboratório e por ter cedido o material para uma parte da análise em gel de poliacrilamida.

Às colegas do laboratório de Genética vegetal (USP – Ribeirão Preto), Juliana Massimino Feres e Marcela Corbo Guidugli pela grande ajuda e ensinamentos na montagem do gel de poliacrilamida e análise estatística.

Aos colegas do laboratório de Genética e Melhoramento Animal (UNESP – Jaboticabal) Fernanda Monsalves pela ajuda na montagem dos géis de poliacrilamida, Patrícia, Gregório e Larissa pela companhia nos almoços, Paula Ribas pelos esclarecimentos de dúvidas sobre genotipagem e Haroldo pela grande ajuda na análise estatística final.

Às colegas do laboratório de Genômica comparativa (UNESP – Rio Preto), Mariana e Daniela pelas tantas horas de trabalho, pela ajuda na realização dos experimentos e pelas muitas conversas e risadas, e em especial à amiga Nedenia, pelos conselhos, incentivos nos momentos mais difíceis, pela ajuda incondicional que ela me ofereceu, orientação, aprendi muito com ela, e principalmente pela paciência durante o tempo em que fiquei hospedada em sua casa. Obrigada pela hospedagem, pela amizade e pelas muitas conversas na padaria.

Às grandes amigas Aline e Eliandra, pelos momentos agradáveis e por todos esses anos de amizade, companheirismo e incentivos.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal (Roberta Vantini, Isabel Ap. Penariol, Ivo e Edson) e ao técnico do laboratório de Genética e Melhoramento Animal (João) que sempre estiveram presentes e prontos para ajudar no desenvolvimento do meu mestrado.

A todos os colegas Pós-graduandos e estagiários do Departamento de Reprodução Animal (Clara, Maria Emília, Nayara, Max, Marcelo, Michelly e todos os outros que passaram pelo departamento) por ajudarem de alguma forma na realização deste trabalho.

A todas as “bruxas” Aline, Ana Paula, Letícia, Fernanda, Carol, Adriana, Verônica e Nedenia que estiveram presentes em algum momento durante a realização desta dissertação.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, que me acompanharam durante todo o decorrer do meu mestrado.

Aos meus irmãos Janaina, Rafael e Rodrigo, por alegrar minha vida e compartilhar os momentos importantes.

A todos os meus familiares, avó, tios, primos, sogros, cunhados e afilhadas que sempre estiveram ao meu lado, incentivando na conquista dessa nova etapa da minha vida.

Ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal da FCAV – UNESP, bem como a Prof^a. Dr^a. Lucia Galvão de Albuquerque, coordenadora do programa, e todos os docentes que o compõe, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O Búfalo.....	3
2.1.1 Os bubalinos no Brasil.....	4
2.2 Importância da variabilidade genética de raças bubalinas comerciais para o melhoramento genético animal.....	6
2.2.1 Características produtivas.....	8
2.2.2 Caracterização genética.....	9
2.2.3 Marcadores moleculares do tipo microsatélite.....	10
2.2.4 Pesquisas utilizando marcadores moleculares.....	14
2.3 Cromossomo 6 bubalino BBU6.....	16
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Origem dos animais.....	21
4.2 Coleta e seleção das amostras.....	22
4.3 Extração do DNA.....	23
4.4 Seleção dos marcadores microsatélites.....	23
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	26
4.7 Análise estatística.....	28
4.7.1 Cálculo da diversidade genética.....	28

4.7.2 Equilíbrio de Hardy – Weinberg (EHW).....	29
4.7.3 Diferenciação genética entre as raças de búfalos comerciais.....	30
4.7.3.1 Diferenciação genética entre pares de raças (Pairwise F_{ST}).....	31
4.7.4 Conteúdo de informação polimórfica (PIC).....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Extração do DNA.....	32
5.2 Obtenção dos produtos amplificados.....	34
5.2.1 Padronização do <i>primer</i> MB099.....	36
5.3 Caracterização dos locos microssatélites.....	37
5.3.1 Locos polimórficos.....	37
5.3.2 Estrutura genética.....	39
5.3.2.1 Loco CSSM054.....	39
5.3.2.2 Heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e).....	43
5.4.2 Diferenciação genética entre as raças e entre os pares de raças (Índice de fixação).....	45
5.4.3 Conteúdo de informações polimórficas (PIC).....	47
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE 1	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB	Associação brasileira de criadores de búfalos
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
BBU	Cromossomo bubalino
BBURH₅₀₀₀	Painel RH para o genoma do búfalo
BTA3	Cromossomo 3 bovino
cm	centímetro
cM	centimorgan
°C	celsius
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Dideoxinucléotídeo livre
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EST	Etiquetas de sequências expressas (<i>Expressed Sequence Tag</i>)
g	grama
Kb	quilo base
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
M	molar
mA	milíampere
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
OAR1	Cromossomo 1 ovino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIC	Conteúdo de informação polimórfica
pH	potencial hidrogeniônico
QTL	Locus de característica quantitativa (<i>Quantitative Trait Loci</i>)
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Painel RH	Painel de clones celulares híbridos
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSR	Sequências simples repetidas
STS	<i>Sequence Tagged Sites</i>
V	Volts
VNTR	Número de sequências variáveis repetidas em <i>tandem</i> (<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>)
µL	microlitro

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Raça, Número de animais (N), municípios de origem dos animais e sexo.....	21
Tabela 2. Marcadores microssatélites específicos de búfalos incluindo a unidade de repetição do microssatélite, tamanho aproximado dos fragmentos (pb), sequência dos <i>primers</i> e temperatura de anelamento.....	24
Tabela 3. Gradiente de temperaturas de anelamento do <i>primer</i> MB099.....	36
Tabela 4. Loco polimórfico (CSSM054), número de animais genotipados (N), número médio de alelos por loco (A) e número efetivo de alelos por loco (Ae) nas três raças de búfalos de rebanhos brasileiros.....	39
Tabela 5. Alelos no loco CSSM054 e suas respectivas frequências estimadas as raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah.....	40
Tabela 6. Heterozigosidade observada (Ho) e Heterozigosidade esperada (He) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco CSSM054.....	43
Tabela 7. Probabilidades obtidas para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e valor de p nas três raças de búfalos de rebanhos brasileiros.....	45
Tabela 8. Valores de f e Theta para o loco CSSM054 considerando as três raças de búfalos comerciais de rebanhos brasileiros.....	46
Tabela 9. Valor de Theta para o loco CSSM054 considerando as raças duas a duas (Pairwise F_{ST}).....	47
Tabela 10. Valores de PIC par o loco CSSM054 nas três raças de búfalos de rebanhos brasileiros.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Bulbo folicular de pelo de búfalo contendo células (seta preta) para extração de DNA.....	22
Figura 2. Eletroforograma de gel de agarose 1% corado com GelRed™(Biotium), mostrando a qualidade do DNA extraído de 30 animais raça Mediterrâneo (A1 a A31) e 8 animais da raça Jafarabadi (B2 a B9). M: Marcador de DNA de peso molecular 100 pb.....	32
Figura 3. Eletroforograma de gel de agarose 1% corado com GelRed™(Biotium), mostrando a qualidade do DNA extraído de 22 animais raça Jafarabadi (B10 a B31) e 30 animais da raça Murrah (C1, C2, C5 a C20, C22 a C34). M: Marcador de DNA de peso molecular 100 pb. (*) amostras que não apresentaram bandas.....	33
Figura 4. Eletroforograma de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando o resultado da PCR com o DNA de um animal da raça Jafarabadi com os <i>primers</i> selecionados neste trabalho. 1: Loco CSSM054; 2: Loco IDVGA-53; 3: Loco BL-41; 4: Loco MB099; B: Controle negativo da PCR (sem adição de DNA); M: Marcador de DNA de peso molecular 100pb.....	34
Figura 5. Eletroforograma de gel de agarose 2% corado com GelRed™(Biotium), com a amplificação do <i>primer</i> MB099 utilizando oito temperaturas de anelamento diferentes em um pool de DNA de pelo. M: Marcador de DNA de peso molecular 100pb.....	36
Figura 6. Distribuição das frequências dos alelos no loco CSSM054 nas raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah.....	41
Figura 7. Número de indivíduos e genótipos encontrados no loco CSSM054 nas raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah.....	42

ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DO CROMOSSOMO 6 EM RAÇAS BUBALINAS COMERCIAIS DO BRASIL

RESUMO - Os búfalos possuem importância econômica como animais de produção no cenário agropecuário brasileiro e mundial. O conhecimento de polimorfismos em marcadores microssatélites mapeados em búfalos é imprescindível para auxiliar em questões evolutivas da espécie, variabilidade genética intra e inter-populacional, além de serem potencialmente úteis para os programas de melhoramento animal. Foram utilizadas três raças comerciais bubalinas, Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah de rebanhos brasileiros para análise de polimorfismos visando avaliar a diversidade genética existente dentro e entre as raças. Foram analisados 30 animais de cada raça pela amplificação do DNA genômico extraído do bulbo de pelos utilizando quatro locos microssatélites localizados em um cromossomo de interesse econômico. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida desnaturante. O loco IDVGA-53 não obteve sucesso na amplificação e foi descartado das análises de polimorfismo. Os locos MB099 e BL41 foram monomórficos. Os parâmetros de diversidade foram gerados para o loco CSSM054, o único polimórfico, com média de 3,33 alelos por loco. A heterozigosidade observada com média de 0,503 foi maior que a esperada, indicando excesso de heterozigotos. As raças Mediterrâneo e Jafarabadi apresentaram desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg. O parâmetro Theta indicou evidências de que as três raças diferem entre si, e quando analisadas duas a duas foi possível verificar alta estruturação populacional entre elas. A maior distância genética foi verificada entre as raças Mediterrâneo e Murrah. O conteúdo de informação polimórfica revelou que o loco CSSM054 foi altamente informativo para a raça Mediterrâneo, portanto, considerando todos os resultados, essa raça apresentou maior variabilidade genética.

Palavras-Chave: BBU6, *Bubalus bubalis*, DNA, PCR, Variabilidade genética

POLYMORPHISM ANALYSIS OF MICROSATELLITE MARKERS ON CHROMOSOME 6 COMMERCIAL BUFFALO BREEDS IN BRAZIL

SUMMARY – The buffalo water are economically important livestock in Brazilian global and agricultural scenario. The knowledge of polymorphisms in microsatellites markers mapped in buffaloes is essential to assist in evolutionary studies of species, genetic variability within and between populations, as well as being potentially useful for animal breeding programs. Three commercial breeds of buffalos (Mediterranean, Jaffarabadi and Murrah) of Brazilian herds were used for polymorphisms analysis to evaluate the genetic diversity within and among them. In each breed 30 animals were analysed by amplification of genomic DNA extracted from the hair bulbs using four microsatellite loci located on a chromosome of economic interest. PCR products were separated by vertical electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel. The IDVGA-53 locus was not successful in amplifying and was discarded from the analysis of polymorphism. The loci MB099 and CSSM054 were monomorphic. The parameters of diversity were generated for the locus CSSM054, the only polymorphic, with an average of 3.33 alleles per locus. With a mean value of 0.503, the observed heterozygosity was higher than the expected, indicating excess of heterozygotes. Mediterranean and Jaffarabadi breeds had deviation of Hardy-Weinberg equilibrium. The parameter Theta indicated evidence that the three breeds differ and when they were analyzed in pairs, it was observed high population differentiation among them. The largest genetic distance was found between the Mediterranean and Murrah breeds. The polymorphic information content revealed that the locus CSSM054 was highly informative to the Mediterranean breed, therefore considering all the results that race had a high genetic variability.

Keywords: BBU 6, *Bubalus bubalis*, DNA, Genetic variability, PCR

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o maior rebanho bubalino das Américas, estimado em 1,13 milhões de animais (FAO, 2009), incluindo os tipos de pântano e rio. Os bubalinos contribuem para a economia agrícola com produção de leite, carne, couro e força de tração em muitos países altamente populosos (KUMAR et al., 2006; YINDEE et al., 2010).

Diante deste panorama, torna-se necessário um aprimoramento dos programas de melhoramento genético, com a intenção de maximizar a produção de animais geneticamente superiores. Dessa forma, o conhecimento do genoma da espécie apresenta extrema valia para o setor, uma vez que possibilita o uso dessas informações para caracterizar geneticamente raças bubalinas do rebanho brasileiro para características economicamente importantes (USDA AGRICULTURE HANDBOOK N.º 8).

O rastreamento de genótipos superiores pode ser auxiliado pelo uso de marcadores moleculares, já que as variações genéticas estão relacionadas com o genoma do indivíduo. Dentro de um programa de melhoramento genético, esses marcadores podem ser utilizados não só para seleção de indivíduos com características de interesse, mas também para caracterização da variabilidade genética entre indivíduos e/ou populações e em testes de paternidade (DIAS SALMAN et al., 2009).

Com o mapa preliminar do cromossomo 6 bubalino (BBU6), foram desenvolvidos microssatélites específicos para a espécie bubalina, onde 33 novos marcadores foram mapeados neste cromossomo, incluindo 19 genes codificantes, duas ESTs e 12 microssatélites (STAFUZZA et al., 2007). Foram selecionados quatro microssatélites específicos de búfalos: o MB099, o IDVGA-53, o BL-41 e o CSSM054 presentes no mesmo grupo de ligação.

Estudos citogenéticos realizados com o genoma do búfalo de rio envolvendo hibridização *in situ* (IANNUZZI et al., 2003) e genética de células somáticas (EL NAHAS

et al., 2001) identificaram o cromossomo 6 bubalino (BBU6) como homólogo ao cromossomo 3 bovino (BTA3).

O BBU6 é muito interessante considerando que nos cromossomos correspondentes em bovino (BTA3) e ovino (OAR1) foram indicadas regiões com QTLs (do inglês *Quantitative Trait Loci*) relacionadas com produção e qualidade de leite (CALVO et al., 2006).

Com a descoberta de marcadores moleculares úteis para estudos de associação de características de interesse, será possível, no futuro, o desenvolvimento de estratégias de seleção para melhorar a qualidade nutricional dos produtos lácteos do búfalo de rio (PAUCIULLO et al., 2010).

Os marcadores microssatélites apresentam alto nível de variação e têm sido utilizados para análise de diversidade em diferentes espécies de animais de interesse econômico como bovinos (SODHI et al., 2008), ovinos (BHATIA & ARORA, 2007), caprinos (ROUT et al., 2008) e búfalos, nos quais foram analisados a similaridade/dissimilaridade genética entre diferentes raças indianas utilizando marcadores genéticos de bovinos (KUMAR et al., 2006; VIJH et al., 2008 a,b; MISHRA et al., 2009).

Considerando que na literatura não foram encontrados trabalhos sobre a caracterização genética de populações de búfalos existentes no Brasil utilizando marcadores genéticos espécie-específicos mapeados em um cromossomo de interesse econômico, este trabalho teve como objetivo analisar a existência de polimorfismos de microssatélites em 90 animais de três raças comerciais de búfalos no Brasil (Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah), permitindo a determinação da variabilidade genética entre e dentro dessas raças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Búfalo

O búfalo pertence à família Bovidae, e dentro desta está a subfamília Bovinae, compreendendo os gêneros: *Angra*, *Bibos*, *Bison*, *Bos*, *Bubalus* e *Syncerus*. Os búfalos estão divididos em dois gêneros: os búfalos selvagens de origem africana (*Syncerus*) e os búfalos de origem asiática (*Bubalus*). No gênero *Bubalus*, são encontrados búfalos em estado selvagem e búfalos criados com objetivos econômicos (búfalos domésticos) são os da espécie *Bubalus bubalis* (LENSTRA & BRADLEY, 1999).

A espécie *Bubalus bubalis*, conhecida como búfalo de água, apresenta duas grandes linhagens diferenciadas com base no cariótipo, comportamento e morfologia dos animais: Búfalo de Pântano ($2n=48$) e o Búfalo de Rio ($2n=50$) (IANNUZI et al., 1994; SENA et al., 2003; KUMAR et al., 2006).

Estudos citogenéticos mostraram que o búfalo de rio tem 25 pares de cromossomos, enquanto o búfalo de pântano tem 24 pares. Essas subespécies diferem por um par de cromossomos, uma fusão do braço curto do cromossomo 4 do búfalo de rio com o cromossomo 9, o qual é comparável ao cromossomo 1 do búfalo de pântano. O búfalo de rio tem 5 pares de cromossomos autossomos submetacêntricos e todos os outros, incluindo os cromossomos sexuais, são acrocêntricos (IANNUZI & DI MEO, 2009).

De acordo com estimativas da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a população atual ultrapassa 188 milhões de animais distribuídos em 42 países (FAO, 2009).

2.1.1 Os bubalinos no Brasil

Os búfalos foram introduzidos no Brasil no século XIX, em pequenos lotes originários da Ásia, Europa e Caribe, apresentando hoje o maior rebanho das Américas, estimado em 1,13 milhões de animais (FAO, 2009; BERNARDES, 2007) e sua introdução ocorreu na Ilha de Marajó, estado do Pará, com a vinda de 50 animais da raça Mediterrâneo, seguida de outras importações nas décadas seguintes (ALBUQUERQUE et al., 2006).

Os bubalinos têm sido registrados como bovinos devido à maneira com que o sistema estatístico nacional coleta os dados agropecuários. Assim, acredita-se que haja uma subestimação da real dimensão do rebanho bubalino brasileiro, uma vez que a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB), por levantamentos indiretos e avaliações de abate/desfrute, aponta um rebanho com cerca de 3,5 milhões de animais e crescimento anual de 3% (BERNARDES, 2007), constituindo o maior rebanho fora do continente asiático, chegando a ser maior do que o rebanho de toda a Europa (VALE & RIBEIRO, 2005). O búfalo de água é de origem asiática e teve sua domesticação iniciada na Índia (COCKRILL, 1981) e na China (CHEN & LI, 1989) por volta de 3000 a 6000 anos atrás (YINDEE et al., 2010). Difundiu-se na época do Pleistoceno, a partir do sul da Ásia para a Europa. À medida que o clima tornou-se cada vez mais seco, a sua área de distribuição foi reduzindo-se para Índia, Indonésia e parte do sudeste da Ásia. A introdução de populações de búfalos na Austrália, África e Américas ocorreu no século XIX (KIERSTEIN et al., 2004; YINDEE et al., 2010).

O rebanho brasileiro de búfalos está distribuído em aproximadamente 63% dos animais na região Norte, 10,7% na região Sul, 9,3% no Sudeste, 11% no Nordeste e 6% no Centro-Oeste (IBGE, 2009). De acordo com a ABCB, são reconhecidas três raças de búfalo de rio: Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah e uma raça de búfalo de pântano, denominada Carabao (ABCB, 2010). O padrão racial estabelecido pela ABCB orienta a identificação de animais quando não há registros de origem da formação de um plantel, o julgamento e a seleção de reprodutores machos e fêmeas, bem como o

estabelecimento da aptidão produtiva de acordo com a conformação e o tipo do animal (ANDRADE & GARCIA, 2005).

As características inerentes desta espécie como rusticidade, prolificidade, adaptabilidade, precocidade, docilidade, vida útil até cerca de 15 anos, cinco anos a mais que os bovinos domésticos, aliadas às produções em leite, carne e trabalho, e taxas de natalidade superiores a 80% e de mortalidade inferiores a 3% ao ano, são as responsáveis pelo grande crescimento populacional observado (MOREIRA et al., 1994), elevando cada vez mais o seu desempenho econômico no cenário agropecuário brasileiro e mundial (STAFUZZA, 2010). A seguir estão descritas algumas características das três raças de búfalo de rio, reconhecidas pela ABCB.

Raça Murrah

A raça Murrah é originária do Noroeste da Índia, difundindo-se no Norte do país e no Paquistão. É considerada a melhor produtora de leite dentre as raças bubalinas, sua conformação e tipo indicam aptidão mista com prevalência do tipo leiteiro. Sua pelagem e pele são pretas, assim como os chifres (ANDRADE & GARCIA, 2005). Segundo Marques et al. (2003), em decorrência das poucas importações, o rebanho fundador no Brasil apresenta base genética estreita, muitas vezes ampliada pela introdução de genes da raça Mediterrâneo.

Raça Mediterrâneo

Os animais da raça Mediterrâneo no Brasil descendem de indivíduos importados, em diversas épocas, da Itália para a Ilha de Marajó e mais tarde, para diversos estados do país. É conhecida como búfalo preto ou italiano. Embora tenha sido selecionada para a produção de leite, tem aptidão mista, para leite e carne, devido ao seu porte. Apresenta pelagem e pele totalmente pretas, estendendo-se também aos chifres. Os pelos são mais abundantes nos animais novos (ANDRADE & GARCIA, 2005). De

acordo com Oliveira (1995), houve na raça Mediterrâneo cruzamentos absorventes e assim esta apresenta características das raças Murrah e Jafarabadi, fortalecendo a ideia de que, à exceção dos animais importados, os bubalinos criados no Brasil são do tipo mediterrâneo. São animais de tripla aptidão, pois além de fornecer carne e leite, são incomparáveis no trabalho de tração.

Raça Jafarabadi

A raça Jafarabadi é originária da Índia, Estado de Gujarat. Caracteriza-se pela forma peculiar da cabeça com chifres longos e caídos. São animais de grande porte apresentando aptidão mista, produção de leite e carne. Sua pelagem e pele são pretas em todo o corpo (ANDRADE & GARCIA, 2005). Apresenta duas variedades bem distintas: a Gir e a Palitana. A variedade Gir, de porte menor, apresenta cabeça, ossatura e membros mais leves, chifres mais longos e mais finos, dirigidos para baixo das orelhas. A variedade Palitana, de porte maior, porém, com chifres menores, apresenta crescimento mais rápido e bolsa gordurosa sobre os olhos fazendo com que pareçam mais fechados (ALBUQUERQUE, 2005).

2.2 Importância da variabilidade genética de raças bubalinas comerciais para o melhoramento genético animal

A espécie bubalina já demonstrou que tem espaço garantido como opção pecuária relevante no Brasil. No que se refere a seus produtos (carne, leite e derivados), não restam dúvidas sobre sua excelente qualidade, propriedades sensoriais, nutricionais e mesmo funcionais. Por sua grande adaptabilidade, mostra-se como opção econômica aos mais diversos ambientes. Por sua maior rusticidade, por sua capacidade de transformar gramíneas em derivados de alto valor agregado, como leite e carne (BORGHESE, 2005), bem como uma opção interessante para a ocupação

das áreas rejeitadas pela agricultura de exportação que vem ocupando cada vez mais os terrenos mais férteis (BERNARDES, 2007).

No Brasil, a bubalinocultura se encontra em posição privilegiada, pois detém o maior rebanho da espécie no Ocidente, dispondo de exemplares com produtividade leiteira comparável aos melhores desempenhos, bem mais expressivos que os existentes nos países de origem onde a atividade é relativamente pouco explorada (BERNARDES, 2007).

De acordo com Pereira (2004), o foco do melhoramento genético animal dos rebanhos em países emergentes como o Brasil deve ser o de educar produtores e dirigentes de associações de raça no sentido de incrementar os programas de avaliação genética e o uso mais intensivo de animais comprovadamente superiores. Além disso, segundo Martinez & Machado (2002), em muitas situações o fenótipo não é uma boa indicação do genótipo, pois características produtivas dependem da variação alélica em um grande número de locos, e a expressão gênica destes locos é muito afetada por fatores de meio ambiente. Assim, a seleção de indivíduos baseada na associação entre dados fenotípicos e informações genômicas, é de grande valia.

Vários programas de melhoramento utilizam informações de progênies e seu sucesso depende, entre outros, da precisão na determinação das relações de parentesco, limitada a animais pertencentes a populações caracterizadas para os marcadores genéticos que se pretende utilizar (DODDS et al., 1996). O delineamento de esquemas de acasalamentos que resultem em progênies de fenótipos mais desejáveis tem preocupado os geneticistas desde o início do século. Maior entendimento do padrão de variabilidade genética entre rebanhos poderá ser útil no desenvolvimento de programas de cruzamentos mais racionais (LOFTUS et al., 1994).

2.2.1 Características produtivas

Os bubalinos contribuem para a economia agropecuária pela produção de leite, carne, couro e força de tração em muitos países altamente populosos (KIERSTEIN et al., 2004; ROTH & MAYERS, 2004; KUMAR et al., 2006; YINDEE et al., 2010). Estima-se que a produção brasileira de leite bubalino seja de 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 búfalas em 2500 rebanhos e que existam, pelo menos, 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas no país (BERNARDES, 2007).

O búfalo fornece mais de 5% do suprimento mundial de leite. O leite de búfala possui maior quantidade de gordura, lactose, proteínas e minerais em relação ao leite bovino e pode ainda ser utilizado para produção de manteiga e queijos de alta qualidade (ROTH & MAYERS, 2004, VIJH et al., 2008b; FAO, 2009), características estas que levaram a um aumento na demanda de leite de búfala nas últimas décadas (SENO et al., 2007).

Destacando-se uma expressiva variabilidade produtiva leiteira na espécie, cuja seleção é ainda incipiente, com produções variando muito por lactação, o que indica seu potencial de evolução pela intensificação de processos de seleção e de manejo (BERNARDES, 2007).

Os búfalos apresentam elevado potencial para a produção de carne (CPATU – Embrapa, 2007). A produção anual de carne no Brasil é estimada em 902.000 toneladas, resultantes de 385.000 animais abatidos (FAO, 2009). A carne bubalina comparada à bovina apresenta-se com 40% menos colesterol, 12 vezes menos gordura, 55% menos calorias, 11% mais proteínas e 10% mais sais minerais, sendo, portanto, mais indicada para a saúde humana (CPATU – Embrapa, 2010). Seu couro, apesar de efetiva demanda, principalmente para exportação, é ainda pouco explorado no Brasil, principalmente em função da grande dispersão dos abates o que encarece o transporte e reduz a escala de processamento (BERNARDES, 2007).

O búfalo, portanto, tem se estabelecido como uma importante fonte alternativa de produção de carne e leite, suprindo as demandas de países considerados em desenvolvimento como o Brasil (SILVA et al., 2003).

2.2.2 Caracterização genética

A caracterização genética de populações, raças e espécies diferentes possibilita o estudo da variabilidade genética. O conhecimento da variabilidade genética, por sua vez, é fundamental para os programas de conservação genética de rebanhos em risco de extinção (MACHUGH et al., 1997), pois permite avaliar a distância entre as populações e auxilia na escolha dos animais a serem utilizados na conservação, mediante a estimativa de índices de similaridade entre indivíduos (SPRITZE et al., 2003). Além disso, o conhecimento da diversidade genética intra e inter-raciais poderá evitar a descaracterização, assim como a extinção de raças e/ou tipos (GAMA, 2004), possibilitando ainda a indicação de possíveis acasalamentos, evitando, então, a manutenção de amostras geneticamente similares (SPRITZE et al., 2003.).

Em termos gerais, informações sobre a variabilidade genética existente entre e dentro de populações são fundamentais para se fazer inferências e previsões sobre diversos processos de manutenção de diversidade, tais como endogamia, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural. A obtenção de dados a partir de marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA tem se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies em um curto período de tempo (CIAMPI, 1999).

No documento *Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management* da FAO (2004), propõe-se um programa integrado de manejo global de fontes genéticas de rebanhos utilizando marcadores moleculares do

tipo microssatélite. E com os avanços na biologia molecular, surgiram diversas técnicas para detecção de variabilidade genética que acessam diretamente a sequência de DNA.

A disponibilidade de marcadores genéticos informativos como os microssatélites são essenciais para a construção de mapas genéticos de alta densidade, assim como em estudos de diversidade genética e conservação de espécies para fins de seleção de características de interesse econômico e manutenção máxima da diversidade genética de rebanhos domesticados e naturais (VENÂNCIO, 2008).

O rastreamento de genótipos superiores pode ser auxiliado pelo uso de marcadores moleculares, já que as variações genéticas estão relacionadas ao genoma do indivíduo. Dentro de um programa de melhoramento genético, esses marcadores podem ser usados não só para seleção de indivíduos com características de interesse, mas também para caracterização da variabilidade genética entre indivíduos e/ou populações e em testes de paternidade (DIAS-SALMAN et al., 2009).

2.2.3 Marcadores moleculares do tipo microssatélite

Os marcadores moleculares referem-se a diferenças entre indivíduos nas suas sequências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA e podem ser classificados em função de sua herança, como dominantes e co-dominantes. Em indivíduos diplóides, marcadores co-dominantes permitem a distinção de ambos os alelos homólogos de um loco. Já os marcadores dominantes são menos informativos, pois não permitem distinguir o fenótipo heterozigótico do homozigótico (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

O uso de diferentes marcadores moleculares de natureza dominante e co-dominante é uma estratégia interessante para estudos de diversidade genética. Como é o caso dos marcadores co-dominantes, os quais são multialélicos e polimórficos,

permitindo uma elevada resolução em estudos populacionais, embora a cobertura genômica seja limitada (CIAMPI, 1999; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para verificar a variabilidade genética em nível de DNA, destacando-se: RFLP - *restriction fragment length polymorphism*, RAPD - *random amplified polymorphic DNA*, AFLP - *amplified fragment length polymorphism*, SCAR - *sequence characterized amplified regions*; STS - *sequence tagged sites* e microssatélites. Estes marcadores podem diferir com respeito a características importantes como abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (BUSO et al., 2003).

Entre as classes de marcadores existentes, os marcadores microssatélites ou SSR (*simple sequence repeat* - sequências simples repetidas) são os que se aproximam mais do marcador ideal para os estudos de genética de populações (RAFALSKI et al., 1996; ALMEIDA et al., 2000).

A abundância de certos tipos de repetições varia com a região genômica e sua distribuição também é característica do grupo taxonômico examinado. Microssatélites apresentam-se mais abundantes em regiões não-codificantes do que em regiões codificantes. No entanto, não há diferença em densidade entre regiões intergênicas e íntrons. Ocorrem diferenças também na densidade e/ou distribuição de microssatélites entre os cromossomos sexuais e autossomos em várias espécies (TÓTH et al., 2000; ELLEGREN, 2004), sendo mais abundantes em autossomos.

Os microssatélites formam uma classe de DNA caracterizada por sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em *tandem* que apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, sendo que a maioria das mutações é ocasionada por alterações no número das unidades de repetição (EISEN, 1999). Acredita-se que estas alterações surgem de um mecanismo específico de mutação chamado deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase (TAUTZ & SCHLOTTERER, 1994), que ocorre durante a replicação do DNA e conduz ao aumento ou à diminuição do número

de repetições; ou devido ao fenômeno de *crossing-over* desigual, causado pelo pareamento errôneo destas sequências durante os quiasmas (EISEN, 1999).

As unidades de repetição dos microssatélites são geralmente mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeo, amplamente distribuídas no genoma eucarioto e procarioto (ZANE et al., 2002; ELLEGREN, 2004). Em geral, repetições de mononucleotídeos poli (A/T) são as mais abundantes em todos os táxons, principalmente em primatas. No que diz respeito a repetições pentanucleotídicas, essas são tão abundantes em táxons de mamíferos quanto as repetições de trinucleotídeos em íntrons e regiões intergênicas (TÓTH et al., 2000). A densidade de microssatélites tende a ser positivamente correlacionada com o tamanho do genoma. Entre todos os genomas eucariotos sequenciados, a densidade de microssatélites é maior em mamíferos (ELLEGREN, 2004).

O polimorfismo alélico ocorre em um loco microssatélite devido a mudanças no número de repetições (BUSO et al., 2003). Segundo Oliveira et al. (2006), esses marcadores são classificados de acordo com o tipo de sequência repetida, podendo ser perfeitos (a sequência repetida não é interrompida por nenhuma base), imperfeitos (há um par de bases dentro do motivo de repetição), interrompidos (há uma pequena sequência de bases dentro da sequência repetida do microssatélite) e compostos (em que há duas sequências repetidas distintas adjacentes).

Polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles. Desta forma, se um gene próximo a um marcador causa uma doença, todos os indivíduos afetados na família recebem tanto o marcador como o gene causador da doença (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Os polimorfismos também são responsáveis pela diversidade da espécie. Diferentes fenótipos são decorrentes de diferentes polimorfismos, como, por exemplo, o sistema ABO (OLSSON et al., 2001).

Os marcadores microssatélites possuem todas as características genéticas desejáveis como co-dominância, permitindo a discriminação entre homocigotos e

heterozigotos; ocorrem abundantemente em genomas eucariotos; são multialélicos e suficientemente estáveis – conservados entre espécies relacionadas (BRONDANI et al., 2003; ZUCCHI, 2002); sendo usados em um expressivo número de aplicações biológicas, como por exemplo, mapeamento genético, estudos de população, caracterização genômica e avaliação genética de características complexas. São ferramentas moleculares para o entendimento da similaridade entre segmentos cromossômicos, provendo informações entre espécies e gêneros (SUBRAMANIAN et al., 2003a, BUSCHIAZZO & GEMMELL, 2006), entre indivíduos e/ou populações (DIAS-SALMAN et al., 2009); além de sua fácil utilização em experimentos envolvendo reações em cadeia da polimerase (PCR) (KIM et al., 2004) e, portanto, necessitando de pequena quantidade de DNA.

De acordo com Michelizzi et al. (2010), aproximadamente 67 mil sequências de DNA de búfalo já estão depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), das quais um total de 311 são sequências de microssatélites, porém estes microssatélites ainda precisam ser mapeados.

Embora os microssatélites tenham se tornado um instrumento popular no mapeamento genético e estudos de fluxo gênico, sua utilidade é limitada devido ao alto custo e tempo para desenvolver *primers* específicos para cada espécie. Uma alternativa para eliminar tempo e despesas envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para a espécie de interesse, tais como, construção de bibliotecas genômicas de DNA e sequenciamento de DNA, é a utilização de *primers* heterólogos.

2.2.4 Pesquisas utilizando marcadores moleculares

Na literatura há vários estudos utilizando *primers* heterólogos de microssatélite com a finalidade de avaliar a diversidade genética e a relação entre raças de búfalos e outras espécies de interesse econômico, porém não foi encontrado nenhum trabalho utilizando os mesmos microssatélites selecionados neste estudo. Moore et al. (1995), por exemplo, testaram 80 *primers* microssatélites derivados de bovinos e determinaram os parâmetros de amplificação para ovelhas e búfalos de rio e de pântano. Do total de locos testados, 70% apresentaram algum polimorfismo em bubalinos.

No Brasil, Albuquerque (2005) utilizando *primers* de bovinos caracterizou geneticamente os grupos Carabao e Baio que estão sendo conservados, assim como os grupos Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo, considerados comerciais, e estimou a variabilidade genética entre e dentro dos cinco grupos em 12,27% e 87,73% respectivamente, confirmando uma divergência genética significativa ($P < 0,0001$), já encontrada em análises com RAPD (ALBUQUERQUE et al., 2006). Em um trabalho mais recente no Brasil, Vieira et al. (2010) avaliaram um painel de 14 microssatélites em búfalos Murrah para teste de identificação e verificação de parentesco.

Na literatura mundial, foram selecionados alguns estudos feitos em diferentes localidades, todos eles dando ênfase a raças bubalinas utilizando *primers* heterólogos, os quais estão resumidos a seguir.

Kumar et al. (2006) analisaram dados de microssatélites para similaridade filogenética de oito raças de búfalo na Índia. Foram utilizados 27 microssatélites para definir a variabilidade genética e a similaridade entre as raças, onde puderam agrupar as raças Toda, Jafarabadi e Pandharpuri em uma linhagem cada e Bhadawary, Nagpuri, Surati, Mehsana e Murrah como uma mistura de raças. Também na Índia, Mishra et al. (2009) avaliaram a diversidade genética de Banni, um búfalo da região de Banni e sua similaridade/dissimilaridade com búfalos da raça Murrah utilizando 24 microssatélites bovinos. Foi possível estimar a distância genética, apresentando considerável dissimilaridade genética entre essas duas populações. O tempo de

divergência foi estimado em cerca de 7286 anos. Estes resultados foram decisivos para programas de conservação de populações de búfalos Banni, os quais se apresentam em declínio.

Berthouly et al. (2010) estudaram a estrutura genética de uma população de búfalo de pântano do Vietnã para a implementação de uma estratégia de conservação e melhoramento. Utilizaram 17 microssatélites para genotipagem de 744 animais, mostrando que tanto os valores de diversidade genética quanto a endogamia para búfalos da província de Ha Giang foram elevados.

Na Argentina, Rogberg – Munõz et al. (2010) utilizaram um conjunto multiplex de microssatélites inter-específicos para identificação de búfalos criados no Brasil.

Seguindo um mesmo contexto, Gargani et al. (2009) analisaram a variação genética e a relação entre seis populações de búfalos de diferentes regiões da Turquia, utilizando 26 microssatélites bovinos, revelando na população (Merzifon) que existia uma alta dissimilaridade com as outras raças estudadas. Também revelaram que alguns indivíduos da população Danamandira apareceram claramente separados das populações Afyon, Coskun, Pazar e Thural representadas em um único grupo.

Iorio et al. (2004) estudaram parâmetros de diversidade genética em duas populações de búfalos de regiões distintas do Sul da Itália, utilizando marcadores bioquímicos e moleculares e não verificaram diferenças genéticas significativas entre elas.

Em estudo desenvolvido por Moioli et al. (2001), avaliou-se a diversidade de marcadores microssatélites em três populações de búfalos provenientes da Itália, Grécia e Egito, onde determinados marcadores mostraram-se altamente polimórficos nas três populações e úteis em testes de paternidade e estudos de QTLs. Foi possível ainda verificar a distância do isolamento em cada população e as taxas de endogamia. Ainda neste contexto, Navani et al. (2002) amplificaram 108 marcadores microssatélites heterólogos de bovino para análise genômica em búfalo de rio. Em 75% dos

marcadores houve produto de amplificação discreta e, desse grupo 56% amplificaram sequências polimórficas. Nagarajan et al. (2009), caracterizaram 571 marcadores microssatélites de bovinos em búfalos, destes, 498 foram polimórficos podendo ser utilizados em estudos de genética de populações e em avaliação genética de características complexas em búfalos.

Além de todos estes trabalhos, existem outros que procuram estabelecer um painel internacional de marcadores microssatélites para bubalinos, ou ainda estudar a diversidade genética em populações ou raças. No entanto, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura utilizando *primers* específicos de búfalos para pesquisas com diversidade genética de raças, e pouco se conhece sobre sua efetividade em testes de identificação.

2.3 Cromossomo 6 bubalino (BBU6)

Com os avanços nas pesquisas com bubalinos, foi possível mapear 309 marcadores, cobrindo todos os cromossomos e regiões cromossômicas (IANNUZZI & DI MEO, 2009). Essas pesquisas envolveram principalmente o painel RH para o genoma bubalino (BBURH₅₀₀₀), sendo utilizado, portanto, na geração de mapas RH preliminares de cromossomos específicos (AMARAL et al., 2007; GOLDAMMER et al., 2007; MIZIARA et al., 2007; STAFUZZA et al., 2007; IANELLA et al., 2008; RODRIGUES-FILHO et al., 2008, STAFUZZA et al., 2009) além da primeira geração de mapas de todos os cromossomos deste genoma (AMARAL et al., 2008), apresentado um total de 2621 marcadores derivados de estudos do genoma bovino. Esse elevado número de marcadores resultou em mapas altamente informativos do genoma bubalino, principalmente quando comparados com o genoma bovino, fornecendo resultados relevantes para ambas as espécies (MICHELLIZZI et al., 2010).

Os mapas RH preliminares do BBU1, BBU3, BBU6, BBU7, BBU10 e BBBUX foram baseados em marcadores derivados de estudos do genoma bovino, e mostram que esse genoma é uma fonte útil de marcadores para o mapeamento do genoma do búfalo.

Com o mapa preliminar do BBU6, foram identificados microssatélites específicos para a espécie bubalina, sendo que 33 novos marcadores foram mapeados neste cromossomo, integrando 19 genes codificantes, duas ESTs e 12 microssatélites (STAFUZZA et al., 2007). Esses marcadores foram distribuídos em dois grupos de ligação: um incluindo 21 marcadores (entre eles, 10 microssatélites – MB101, IDVGA-53, RM019, BMS936, CSSM054, BL-41, BMS2075, MB099 e BMS1636) e o outro com 12 marcadores (sendo dois microssatélites – INRA041 e BMS835). A partir do trabalho de Stafuzza et al. (2007) foram otimizados os *primers* para as sequências flangeadoras e as respectivas temperaturas de anelamento.

O BBU6 é o primeiro cromossomo acrocêntrico do cariótipo. É um cromossomo interessante com muito ainda para ser explorado, principalmente se for considerado que nos cromossomos correspondentes em bovino (BTA3) e ovino (OAR1) foram indicadas regiões com QTLs - *quantitative trait loci*, relacionadas com produção e qualidade de leite (CALVO et al., 2006).

O estudo com o BBU6 foi possível devido a pesquisas relacionadas com o seu cromossomo homólogo em bovinos, o BTA3, onde estudos citogenéticos realizados com o búfalo de rio envolvendo hibridização *in situ* (IANNUZZI et al., 2003) e genética de células somáticas (EL NAHAS et al., 2001) identificaram o BBU6 como homólogo ao BTA3.

O BTA3 tem sido descrito como um dos principais cromossomos bovinos portador de regiões de QTL com efeitos pleiotrópicos em múltiplas características relacionadas com produção e qualidade do leite, apresentando vários trabalhos descritos na literatura (HEYEN et al., 1999; PLANTE et al., 2001; FRANK et al., 2002; OLSEN et al., 2002; KHATKAR et al., 2004; SCHULMAN et al., 2004).

Foi encontrada em sites (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>; <http://bovineqtlv2.tamu.edu/index.html>) que resumem os estudos com QTLs bovinos no BTA3, uma região de QTL com efeito sobre a produtividade de matéria gorda láctea, apresentando um intervalo de confiança de aproximadamente 50 cM, na qual foram localizados os genes bovinos ANXA9 e SLC27A3 (CALVO et al. 2006a). Nestes estudos, alguns picos de QTL foram encontrados nos microssatélites ILSTS096 e BL41 (HEYEN ET AL., 1999), os quais estão na posição 1 e 5 cM, e 11 e 15 cM dos genes SLC27A3 e ANXA9, respectivamente .

Ainda em regiões de QTL presentes no BTA3 destaca-se a D3S20-D3S34-D3S3 que controla características relacionadas com a produção de leite, a qual apresenta uma extensa conservação de sintenia entre diversas espécies incluindo humano, camundongo e ovino (FRANK et al., 2002).

Em uma revisão sobre marcadores mapeados no genoma do búfalo de rio, publicado por Iannuzzi et al. (2003), havia somente 6 genes (ACADM, CRP, HSD3B1, NGFB, NRAS e UOX) e 6 marcadores do tipo microssatélite (BM723, D3S2, D3S25, D3S29, D3S4 e S100A6) no BBU6. Por outro lado, um mapa do tipo RH do BTA3 (EVERTS-VAN DER WIND et al., 2004, apresentava um total de 88 marcadores, e portanto com muito ainda para ser explorado.

A utilização desses marcadores direcionados a grupos de características econômicas segregantes em uma população pode revelar associações entre as regiões de interesse e os respectivos marcadores, desse modo tornando-os úteis à seleção dessas características (EL-NAHAS et al., 2001; NAGARAJAN et al., 2009).

Portanto, a análise de polimorfismos em marcadores microssatélites torna-se de fundamental importância para identificação e manipulação de genes responsáveis por características de interesse econômico como resistência a parasitas, ganho de peso, produção e qualidade de leite, produção e qualidade de carne, fertilidade e reprodução, que poderão ser aplicados em estratégias racionais para otimizar a utilização e

conservação da variabilidade genética em búfalos, no melhoramento genético desses animais e em um maior retorno econômico para o setor (KUMAR et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Utilizar dados moleculares obtidos de marcadores microssatélites previamente mapeados no cromossomo 6 bubalino para análise da existência de polimorfismos em raças comerciais criadas no Brasil.

3.2. Objetivos específicos:

- Realizar um estudo de caracterização da diversidade genética das raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah, estimando a variabilidade genética através de marcadores microssatélites;
- Prospectar os marcadores microssatélites específicos para as raças estudadas os quais possam ser utilizados para rastreamento de melhores progenitores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Comparativa, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/ UNESP, Campus de São José do Rio Preto e no Laboratório de Genética e Melhoramento Animal, do Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

4.1 Origem dos animais

Foram selecionados para o estudo 90 animais de três raças bubalinas comerciais, criadas no Brasil (Tabela 1). A raça Mediterrâneo (N=30) com animais provenientes de uma propriedade particular no Estado de São Paulo; a raça Jafarabadi (N=30) com animais provenientes de duas propriedades particulares, uma no Estado do Pará e a outra no Estado de São Paulo; e a raça Murrah (N=30) com animais provenientes de três propriedades particulares, duas no Estado do Pará e uma no Estado de São Paulo. Os animais utilizados nessa pesquisa eram registrados na Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB).

Tabela 1. Raça, Número de animais (N), municípios de origem dos animais e sexo.

Raça	N	Município	Sexo
Mediterrâneo (A)	30	Itatiba-SP	2 M
			28 F
Jafarabadi (B)	20	Belém-PA	7 M
			13 F
		Sales Oliveira-SP	10 F
Murrah (C)	12	Belém-PA	2 M
			10 F
		Belém-PA	13 F
			5 F
	5	Ribeirão Preto-SP	5 F
Total de animais	90		

M: Macho; F: Fêmea

4.2 Coleta e seleção das amostras

Foram retirados manualmente cerca de 40 pelos da cauda de cada animal preservando a integridade dos bulbos foliculares. Logo que retirados, os pelos foram colocados em envelopes de papel, identificados e armazenados em temperatura ambiente.

Do total de pelos retirados, cinco foram selecionados visualmente a partir da presença de células no bulbo folicular (Figura 1). Assim que selecionados, a região do bulbo foi cortada em tamanhos de 0,5 a 0,75 cm, e adicionados em microtubo de 0,2 mL para posterior extração do DNA genômico.



Figura 1. Bulbo folicular de pelo de búfalo contendo células (seta preta) para extração de DNA.

4.3 Extração do DNA

O DNA genômico dos bulbos foliculares foi extraído seguindo o protocolo proposto pelo Laboratório de Genômica Comparativa, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE – UNESP, Campus de São José do Rio Preto, próprio para extração de DNA de pelo.

O procedimento para a extração de DNA consistiu da preparação de uma solução de extração contendo 920 µL de água ultrapura, 80 µL de tampão para reação em cadeia da polimerase (PCR) 10X sem MgCl₂ (pH 8,5), 5 µL de Proteinase K (19,2 mg/mL) e 1 µL de SDS (GIBCO) 1%. Foram adicionados 50 µL desta solução em microtubo de 0,2 mL contendo os pelos e em seguida foram levados ao termociclador MJ Research, modelo PTC-200 por 1 hora a 56 °C, seguido por 45 minutos a 95 °C e finalizado com o resfriamento a 4 °C.

A quantificação do DNA foi feita em aparelho Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Uniscience) e confirmada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (1 ng/µL), visualizados sobre transiluminador de luz ultra-violeta e fotodocumentados com câmera digital do tipo DC290 Kodak™. Em média as amostras apresentaram 330 ng/µl de DNA.

Esse mesmo gel de agarose possibilitou verificar a integridade do DNA. Foram utilizados 5 µL de DNA de cada animal para verificar se estava íntegro e sem nenhum sinal de degradação. As amostras foram então estocadas a 4 °C para posterior amplificação por PCR.

4.4 Seleção dos marcadores microssatélites

Foram selecionados quatro microssatélites (MB099, IDVGA-53, BL-41 e CSSM054) entre uma lista de 12 marcadores mapeados por Stafuzza et al. (2007) e

derivados de estudos do genoma bovino (IHARA et al., 2004). A escolha desses microssatélites deveu-se ao fato de estarem presentes no mesmo grupo de ligação e não apresentarem trabalhos na literatura. Os *primers* tiveram as condições da PCR e a temperatura de anelamento otimizadas com DNA de búfalo, portanto são específicos para essa espécie. A unidade de repetição, tamanho aproximado dos fragmentos, sequência dos *primers* e temperatura de anelamento dos microssatélites encontram-se na Tabela 2.

Os marcadores microssatélites selecionados estão localizados no cromossomo 6 bubalino (BBU6), o qual tem sido identificado em estudos citogenéticos utilizando técnicas de hibridização *in situ* e células somáticas como homólogo do cromossomo 3 bovino (BTA3) (EL NAHAS et al., 2001; IANNUZZI et al., 2003), onde numerosos QTLs com efeitos pleiotrópicos para múltiplas características de produção de leite tem sido mapeados (KHATKAR et al., 2004), portanto um importante cromossomo para estudos de características de interesse econômico.

Tabela 2. Marcadores microssatélites específicos de búfalos incluindo a unidade de repetição do microssatélite, tamanho aproximado dos fragmentos (pb), sequência dos *primers* e temperatura de anelamento.

Loco	Unidade de Repetição	Tamanho aproximado (pb)	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	T (°C)
MB099*	(AC)21	200	F: CTGGAGGTGTGTGAGCCCCATTTA R: CTAAGAGTCGAAGGTGTGACTAGG	65
IDVGA53*	(TG)11	200	F: ACGGGACGCCTCGGTCAAGT R: GAAGGGGAAGGGGAAGATGAAC	65
BL41*	-	250	F: CCTCTGCCATCTTTATTCCG R: AAGATCAACTTATTCTCAGAGTGG	65
CSSM054*	(GT)12	150	F: AAACACATGGAGAATCAGACCTCC R: TTCCAACAACCGTAGCACCTCCTG	65

T: Temperatura de anelamento dos *primers*; *: IHARA et al. (2004)

O microssatélite MB099 em bovino apresenta 11 alelos, faixa de tamanho de 160 a 184 pares de base; o microssatélite IDVGA-53 apresenta três alelos e faixa de tamanho de 218 a 224 pares de base; o BL-41 apresenta 10 alelos e faixa de tamanho de 236 a 258 pares de base e o CSSM054 três alelos e faixa de tamanho de 119 a 123 pares de base, além de apresentarem genes relacionados à qualidade do leite.

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações por PCR foram realizadas em Termociclador PTC - 200 (M.J. - Research, Inc. – Waltham, M.A. – USA), em um volume total de 10 μ L, contendo: 100 mM de dNTP, 0,2 mM de cada um dos *primers* (senso e anti-senso), 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de tampão 10X, 4,3 μ l de água ultrapura, 0,5 U de Taq polimerase True Start™ Hot Start (Fermentas – Sinapse Biotecnologia - Lituânia) e 100 ng de DNA genômico.

Os parâmetros de ciclagem foram os seguintes: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento de 65 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguida de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Para cada reação foi mantido um tubo contendo água ultrapura como controle negativo.

Foram realizados dois testes de amplificação das amostras de DNA extraídas com cada par de *primers*; após isso, mantido o insucesso, o loco era excluído do estudo.

A amplificação foi verificada em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo e visualizados por um transiluminador de luz ultravioleta, no sistema de foto documentação digital Eagle-Eye (Stratagene®). Para confirmação da amplificação, 3 μ l do produto da reação de PCR foram aplicados.

Depois de confirmada a amplificação, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante. Um dos *primers* quando submetido a genotipagem em gel de poliacrilamida não obteve sucesso na amplificação, sendo necessário testar as condições de PCR, e o procedimento utilizado foi um gradiente de temperatura, que se baseia na reação em cadeia da polimerase (técnica descrita acima), selecionando um intervalo de temperaturas de interesse.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após as confirmações de amplificação nos locos selecionados, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida para a genotipagem dos locos microssatélites. Para tais finalidades, foi utilizado gel de poliacrilamida desnaturante a 10% (acrilamida/bisacrilamida 29:1 e uréia), concentração ideal para microssatélites dinucleotídeos, seguida por coloração com nitrato de prata.

O protocolo de preparo do gel de poliacrilamida desnaturante utilizado neste estudo foi obtido do Laboratório de Conservação de Recursos Genéticos Florestais do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Para o preparo do gel desnaturante 10% foram necessárias:

- 14,4 g de uréia 10,0 mL de solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1);
- 3,0 mL de TBE 10X (108,0 g de Tris; 53,0 g de ácido bórico; 40,0 mL de solução de EDTA pH 8,0 e completar o volume para 1 litro de água destilada);
- 22,5 µL de TEMED;
- 450 µL de solução de persulfato de amônio e água destilada.

Após a polimerização, os poços foram lavados com água destilada para retirar o excesso de solução não polimerizada de poliacrilamida. Na sequência, o gel foi fixado em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE 1X (100 mL de tampão TBE 10X

e 900 mL de água destilada) em ambos os pólos (porção superior e inferior) e os produtos de amplificação foram aplicados.

Antes da aplicação no gel, os produtos de amplificação foram desnaturados a 94 °C por seis minutos e imediatamente resfriados em gelo para diminuir a taxa de anelamento das fitas de DNA do material amplificado antes de serem aplicados no gel desnaturante. O preparo dos produtos de amplificação para desnaturação consistiu de: 5 µL de tampão de amostra (900 µL de bromofenol; 900 µL de xilenocianol; 900 µL de TBE 10X; 4,5 mL de Ficol 30 % diluído em água destilada, 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 e 3,6 g de sacarose; na proporção de 3:1 com formamida) em tubo *ependorf*, junto com 3 µL do produto amplificado. A cuba foi conectada a uma fonte de eletroforese *Amershan Pharmacia Biotech* (EPS 1001) ajustada a uma corrente constante de 25 mA, voltagem livre durante 3 horas e 30 min.

Para garantir a isenção de qualquer viés proveniente da eletroforese de cada gel analisado, amostras controle foram selecionadas para serem repetidas em todas as corridas. Portanto, qualquer deslocamento de determinado alelo, calculado em distância da posição de corrida eletroforética no gel, pode ser identificado entre um gel e outro.

Com o término da corrida eletroforética, o gel foi retirado cuidadosamente das placas de vidro e submetidos aos processos de coloração de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti et al. (1994):

- **Fixação:** após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200 mL de solução fixadora (160 mL de etanol (PA); 7,0 mL de ácido acético glacial (PA) e 833 mL de água destilada);
- **Impregnação com nitrato de prata:** adicionou-se 3,0 mL de solução de nitrato de prata 20% (2,0 g de nitrato de prata dissolvidos em 10 mL de água destilada), e agitou-se por cinco minutos. A solução foi então descartada e o gel foi lavado rapidamente em água pré-aquecida (40°C) por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando-se a água.

- **Revelação:** 200 mL de solução reveladora (22 g de NaOH dissolvidos em 1 litro de água destilada) foram despejados cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 1,5 mL de formaldeído, sendo submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução reveladora foi pré-aquecida em estufa (40°C) para facilitar a reação de coloração.
- **Bloqueio da reação:** após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 200 mL de solução fixadora.

Após esse processo de revelação, o gel foi conservado entre folhas de papel celofane para análise.

A constituição genotípica dos indivíduos foi determinada, para cada loco, por meio da análise da presença de alelos. Os alelos de todos os locos para cada um dos indivíduos foram identificados por ordem crescente de tamanho, definida pela migração eletroforética, ou seja, os alelos de menor tamanho migram mais rápidos (numerados primeiro) e os de maior tamanho têm uma migração mais lenta (numerados em ordem crescente), o tamanho desses alelos foi determinado pela comparação com marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen).

4.7 Análise estatística

4.7.1 Cálculo da diversidade genética

A partir do padrão de bandas obtido para cada loco de microssatélites foram calculados os índices de diversidade genética para as três raças estudadas. A variabilidade genética foi estimada através de estatística descritiva que determinou o número de locos polimórficos, número de alelos por loco, heterozigosidade observada

(H_o) e esperada (H_e) usando-se o programa GDA (*Genetic Data Analysis*, LEWIS & ZAYKIN, 2001). A heterozigosidade observada (H_o) é uma medida da variabilidade genética das populações e reflete a quantidade de indivíduos heterozigotos para um determinado loco. A heterozigosidade esperada (H_e) é a medida que reflete a quantidade de indivíduos heterozigotos que é esperada de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.7.2 Equilíbrio de Hardy – Weinberg (EHW)

De acordo com Falconer & Mackay (1996), em uma população grande com acasalamento ao acaso, ausência de seleção, de mutação, de migração e de deriva genética, as frequências alélicas e genóticas são constantes, geração após geração, e estas propriedades são derivadas do princípio de Hardy-Weinberg. Quando se considera mais de um loco, a manutenção do equilíbrio de Hardy-Weinberg depende da recombinação entre ambos os locos. Se a recombinação é grande, próxima de 1, então os locos não estão ligados e a seleção para um loco não retira do equilíbrio o outro loco. Entretanto, se os locos estão ligados, a seleção para um dos locos retira ambos do equilíbrio.

Os testes mais comuns para EHW são os testes de qui-quadrado para as proporções esperadas e observadas de heterozigotos. Entretanto, este teste produz resultados imprecisos quando há um ou mais genótipos raros. Uma solução é o agrupamento de categorias, a fim de minimizar o viés introduzido. Mesmo assim, o qui-quadrado só é recomendado para estudos preliminares (WEIR, 1996).

O teste exato ou de probabilidade (HALDANE, 1954, apud WEIR, 1996) para proporções de EHW baseia-se na rejeição da hipótese caso o conjunto de dados possua valor baixo de probabilidade. O teste exato é bilateral e o excesso ou falta de heterozigotos podem levar a valores de p pequenos, rejeitando a hipótese de equilíbrio.

O problema do teste consiste em identificar os valores de significância quando há muitos arranjos de genótipo que possam ocorrer (maior número de alelos).

O teste exato foi implementado por Guo & Thompson (1992) quando há mais de dois alelos por loco. Este utiliza o método da cadeia de Markov (muitos dados) para obter amostras aleatórias a partir dos dados originais (permutação). Foram realizadas 10.000 permutações aleatórias para construir a distribuição empírica da hipótese nula, de modo que o valor de p representa a proporção de permutações em que a estatística da distribuição simulada excedeu o valor obtido com dados reais. O método calcula o erro padrão da estimativa p , que deve ser menor que o nível de significância. O valor de p é dado pela probabilidade agregada de todos os arranjos genotípicos amostrados, com a mesma frequência de alelos.

O teste de aderência ao EHW para o loco nas três raças de búfalos foi feito usando-se o pacote *genetics* do programa R (*R Development Core Team, 2011*).

4.7.3 Diferenciação genética entre as raças de búfalos comerciais

O cálculo das estatísticas F foi realizado utilizando-se o programa Hickory v. 1.0.4 (HOLSINGER & LEWIS, 2006), que os calcula a partir das frequências alélicas e genotípicas de Weir & Cockerham (1984). Foi feita uma distribuição *a posteriori* dos parâmetros simulando-se numa cadeia de 250.000 ciclos (burn-in = 10.000, thin = 50). Foram empregados flat *priors* para as estatísticas f , Theta e frequências alélicas.

Theta é uma estatística que mede a divergência genética entre populações (raças), diretamente comparável ao índice F_{ST} , segundo a abordagem de Weir & Cockerham, 1984. Por sua vez, “ f ” segue definição similar ao índice F_{IS} (endogamia dentro das populações).

A análise dos valores de Theta (F_{ST}) foi feita considerando-se a classificação de Nei (1978) *apud* Giacomoni (2002) onde: valores de F_{ST} menores que 0,05 são considerados baixos, entre 0,05 e 0,15 médios e maiores que 0,15 altos, indicando estruturação populacional baixa, média e alta, respectivamente.

4.7.3.1 Diferenciação genética entre pares de raças (Pairwise F_{ST})

Para a avaliação do grau de diferenciação genética entre as raças estudadas, foi utilizada a estimativa do parâmetro Theta (F_{ST}) (HOLSINGER & LEWIS, 2006) que, mediante a combinação de várias medidas de heterozigosidade a diferentes níveis, permite uma descrição detalhada da estrutura populacional (HARTL & CLARK, 2007). Esse parâmetro foi calculado por meio de permutações paramétricas entre as raças, utilizando-se o programa Hickory v. 1.0.4 (HOLSINGER & LEWIS, 2006).

4.7.4 Conteúdo de informação polimórfica (PIC)

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para um determinado marcador refere-se à parcela da progênie na qual é possível determinar, exatamente, de qual progenitor os alelos provieram. O PIC é dependente do número de alelos por loco e da distribuição das frequências desses alelos na amostra. De acordo com Botstein et al. (1980), esse parâmetro é um indicador da utilidade do marcador em estudo genético (segregação, identificação de população e controle de paternidade).

Consideram-se os valores de PIC acima de 0,5 muito informativo; moderadamente informativos os compreendidos entre 0,25 e 0,5 e pouco informativos os inferiores a 0,25 (BOTSTEIN et al. 1980).

Esse parâmetro foi calculado utilizando o programa R (*R Development Core Team*, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do DNA

As Figuras 2 e 3 representam os eletroforogramas dos géis de agarose das 90 amostras de DNA dos animais, em que pode ser observada a qualidade do DNA extraído. Do total de amostras, 88 (97,7%) apresentaram resultado satisfatório quando submetido ao gel de agarose, apresentando um padrão de bandas excelente. Apenas duas amostras (2,3%) não apresentaram bandas. Esta pequena falha provavelmente deveu-se a problemas laboratoriais, pois as mesmas amostras apresentaram resultados satisfatórios em outros testes. O DNA extraído visualizado por eletroforese em gel de agarose (1%) mostrou-se íntegro e sem quaisquer sinais de degradação.

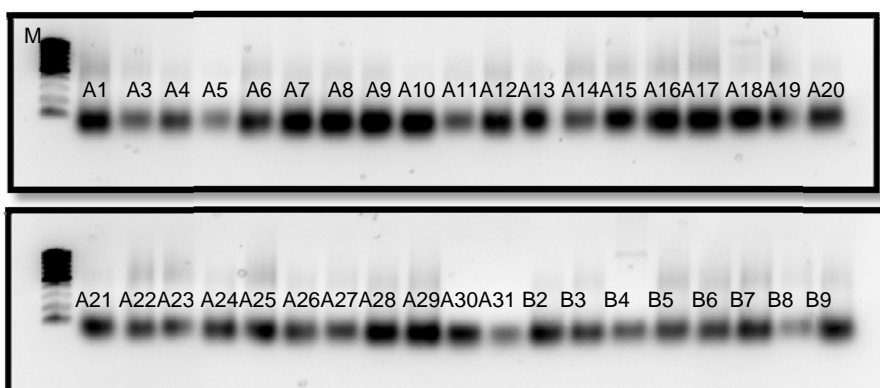


Figura 2. Eletroforograma de gel de agarose 1% corado com GelRed™(Biotium), mostrando a qualidade do DNA extraído de 30 animais da raça Mediterrâneo (A1 a A31) e 8 animais da raça Jafarabadi (B2 a B9). **M:** Marcador de DNA de peso molecular 100 pb.

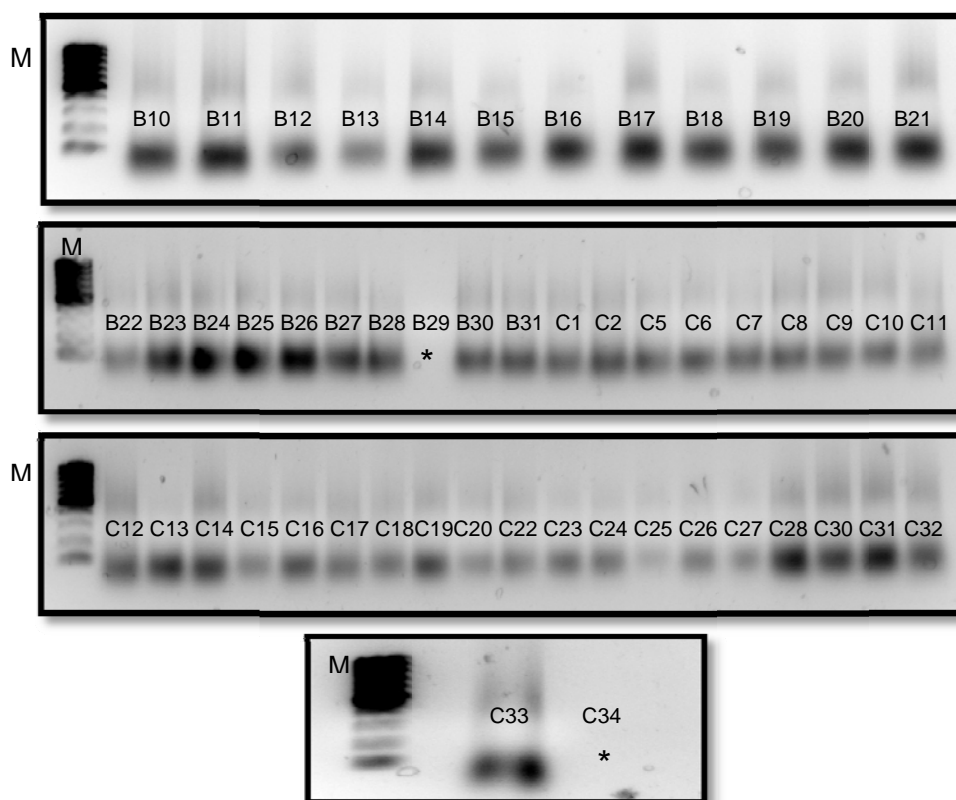


Figura 3. Eletroforograma de gel de agarose 1% corado com GelRed™(Biotium), mostrando a qualidade do DNA extraído de 22 animais da raça Jafarabadi (B10 a B31) e 30 animais da raça Murrah (C1, C2, C5 a C20, C22 a C34). **M:** Marcador de DNA de peso molecular 100 pb. (*) amostras que não apresentaram bandas.

A partir do resultado da extração do DNA, foi possível verificar que o método utilizado funcionou de maneira eficiente. O método de extração foi escolhido pela economia de material biológico, devido a dificuldade em encontrar um número grande de animais para a coleta; pela rapidez, pois necessitou de apenas duas horas em termociclador, portanto, um método muito rápido comparado a outros protocolos de extração de pelo; por necessitar de menos reagentes e por conter reagentes que não geraram resíduos, não apresentando nenhum reagente tóxico (tampão para reação de PCR sem $MgCl_2$, proteinase K e SDS 1%).

Portanto, o método de extração utilizado nesse trabalho pode ser considerado rápido, eficiente e de fácil aplicação, fornecendo DNA livre de inibidores, íntegro e em quantidade suficiente, o que foi crucial para garantir a sensibilidade de técnicas moleculares (SANTOS et al., 2009).

5.2 Obtenção dos produtos amplificados

A Figura 4 ilustra gel de agarose, em que pode ser observado o resultado da amplificação por PCR obtida com os quatro pares de *primers* propostos para este estudo a partir do DNA de um animal da raça Jafarabadi. A análise desse resultado permitiu a verificação da capacidade de amplificação dos *primers* selecionados com a amostra do DNA extraído e também possibilitou o ajuste da temperatura de anelamento destes com a Taq polimerase True Start.

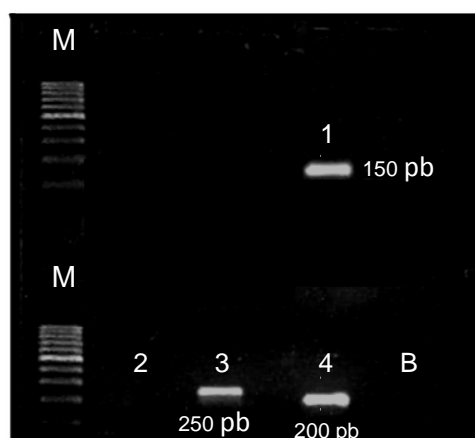


Figura 4. Eletroforograma de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando o resultado da PCR com o DNA de um animal da raça Jafarabadi com os *primers* selecionados neste trabalho. **1:** Loco CSSM054; **2:** Loco IDVGA-53; **3:** Loco BL-41; **4:** Loco MB099; **B:** Controle negativo da PCR (sem adição de DNA); **M:** Marcador de DNA de peso molecular 100pb.

Dos quatro pares de *primers* selecionados, apenas o loco IDVGA-53 não foi amplificado na amostra de DNA, possivelmente pelo fato de não haver conservação de sequência do primer entre bovinos e bubalinos, e, portanto foi descartado das análises. Assim, conseguiu-se sucesso de 75% nos testes de amplificação com a amostra de DNA, e os locos CSSM054, BL-41 e MB099 apresentaram bom padrão de amplificação e ótima qualidade do DNA.

Os microssatélites são marcadores conservados na classe Mammalia (MOORE et al., 1991; SUN & KIRKPATRICK, 1996), principalmente entre espécies mais relacionadas evolutivamente, o que vem a ser uma alternativa que facilita estudos utilizando estes marcadores, através de amplificação heteróloga. Contudo, a amplificação de regiões microssatélites, utilizando *primers* específicos para búfalos, é extremamente delicada e trabalhosa já que não existem trabalhos na literatura para nos ajudar e porque envolve a qualidade do DNA extraído, a pureza do DNA, o manuseio correto dos *primers* e reagentes para PCR, regras muito importante para o sucesso da amplificação.

A partir do sucesso na amplificação utilizando os *primers* selecionados, os produtos de PCR foram submetidos à análise de polimorfismo nas 90 amostras de DNA. O resultado foi visualizado em gel de poliacrilamida desnaturante a 10% e o *primer* MB099 não apresentou amplificação em 65 animais (72,2%). Levando em consideração que 27,7 % dos animais apresentaram amplificação em gel de poliacrilamida e que no teste em gel de agarose para as 90 amostras também obteve amplificação, foi necessário a padronização das condições ideais de PCR do *primer* MB099 para o gel de poliacrilamida desnaturante.

5.2.1 Padronização do *primer* MB099

Para a padronização deste *primer*, foi estabelecido gradiente de temperatura (Tabela 3) com intervalo entre 2°C maior (67°C) e 15°C menor (50°C) que a temperatura padronizada (65°C) e, em seguida, submetido a gel de agarose 2% (Figura 5) para visualização da amplificação e confirmação da temperatura ideal. O objetivo ao alterar-se a temperatura de anelamento foi tentar obter êxito na amplificação em gel de poliacrilamida.

Tabela 3. Gradiente de temperaturas de anelamento do *primer* MB099.

<i>Primer</i>	Temperaturas de anelamento (°C)
MB099	67 – 66 – 64,1 – 60,7 – 56,6 – 53,4 – 51,1 - 50

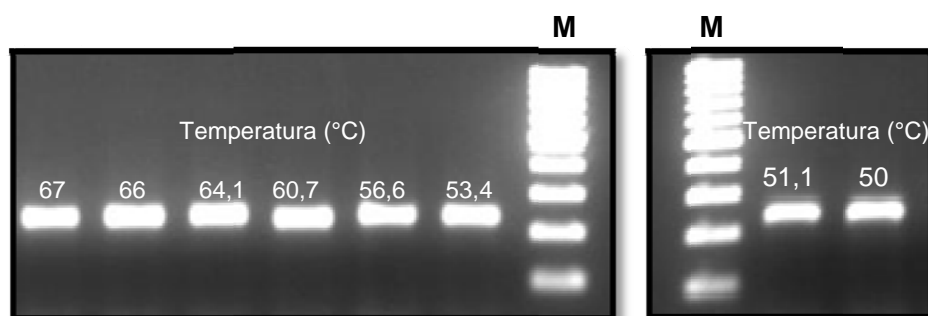


Figura 5. Eletroforograma de gel de agarose 2% corado com GelRed™(Biotium), com amplificação do *primer* MB099 utilizando oito temperaturas de anelamento diferentes em um pool de amostras de DNA de pelo. **M:** Marcador de DNA de peso molecular 100pb.

Os produtos de PCR apresentaram padrão de bandas bem definidas (robustas) e a partir desse resultado foi selecionada uma temperatura mais baixa (64,1°C) que a padronizada para o *primer* MB099 (65°C), pois as análises com gel de poliacrilamida

necessitam de temperaturas de anelamento mais baixas que 65°C para diminuir a quantidade de bandas inespecíficas.

5.3 Caracterização dos locos microssatélites

5.3.1 Locos polimórficos

A análise para verificação da variabilidade genética nas três raças de búfalos com os três marcadores microssatélites que obtiveram sucesso no primeiro teste de amplificação, revelou a presença de dois locos monomórficos (MB099 e BL-41) e um loco polimórfico (CSSM054).

Os locos monomórficos apresentaram fragmentos de aproximadamente 170 pb para o loco MB099 e 280 pb para o loco BL-41 e o loco polimórfico CSSM054 apresentou quatro alelos, porém não foi possível determinar com exatidão o tamanho dos fragmentos, devido a técnica de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida não ser confiável para esta finalidade e o marcador utilizado ser de 100 pb, tornando difícil a definição de pequenas diferenças entre os fragmentos. Assim, cada alelo foi classificado por um número, e o critério seguido, está definido no item 4.6 do material e métodos. Os padrões de bandas dos alelos encontrados para os locos monomórficos e polimórfico podem ser observados nos Apêndices 1A, 1B e 1C respectivamente.

Na tabela 4, considerando apenas o loco polimórfico (CSSM054) pode ser observado o número de indivíduos amostrados (N), número médio de alelos por loco (A) e número efetivo de alelos por loco (Ae) das três raças de búfalos. O número de indivíduos amostrados (N) variou de 27(raça Jafarabadi) a 29 (raças Mediterrâneo e Murrah) de um total de 30 animais genotipados de cada raça (Tabela 4). Esta diferença na amostragem pode ser atribuída a problemas de rotina laboratorial, devido à qualidade do DNA (presença de impurezas) ou erros de pipetagem que acarretam em falhas na amplificação.

Foram identificados quatro alelos entre todos os animais estudados. O número de alelos variou de quatro (raça Mediterrâneo) a três (raças Jafarabadi e Murrah) com média de 3,33 alelos por loco. Barker (1994) sugere que locos de microssatélites utilizados em estudos de distância genética não devem ter menos de quatro alelos. Portanto, o loco utilizado neste trabalho está de acordo com o sugerido pelo autor para análises de diversidade genética apenas na raça Mediterrâneo, pois apresentou a quantidade necessária.

Para a comparação dos resultados não foi encontrado dados na literatura para o loco CSSM054, portanto o estudo em questão foi comparado com raças e conjuntos de microssatélites diferentes. O valor médio de alelo por loco foi inferior ao encontrado por Mishra et al. (2009) em búfalos Indianos das raças Banni e Murrah (5,75), e por O’Ryan et al.,(1998) quando estudaram a diversidade genética em quatro populações de búfalos africanos e encontraram média de 4,7 alelos por loco. Também foi inferior a valores relatados por Berthouly et al. (2010) que encontraram valor médio de alelo por loco superior (5,18) quando analisaram búfalos de uma província do Vietnã de outras raças e por MISHRA et al. (2008) em búfalos Indianos da região de Chilika (4,68) e búfalos Toda (4,20). No entanto, mesmo o índice de riqueza alélica apresentando-se menor que aqueles encontrados na literatura, pode ser considerado similar, pois quando foi analisado apenas um loco polimórfico ou uma raça, verificou-se que apresentaram número de alelos por loco menores ou iguais a quatro, como é o caso de Berthouly et al. (2010) que identificaram 3,4 alelos em uma raça de búfalo da província de Nghe An no Vietnã, e Mishra et al. (2009) que identificaram no loco ILSTS019 três alelos, no loco ILSTS073 dois alelos, e nos locos ILSTS026, ILSTS030, ILSTS017, ILSTS034, ILSTS056, ILSTS089, CSSM66, ILSTS095, ILSTS031, ILSTS060 e BM1818 quatro alelos, valor semelhante ao obtido neste estudo.

Albuquerque (2005) também encontrou menos de quatro alelos nas raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah quando analisou a diversidade genética de cinco raças bubalinas. Na raça Mediterrâneo, foi identificado nos locos INRA 23 e ILSTS05 três alelos cada e no loco CSSM09 quatro alelos, na raça Jafarabadi, os locos INRA 05,

INRA23, CSSM09 e ILSTS05 apresentaram dois, três, três e três alelos respectivamente e na raça Murrah, o loco ILSTS05 apresentou dois alelos.

Tabela 4. Loco polimórfico (CSSM054), número de animais genotipados (N), número médio de alelos por loco (A) e número efetivo de alelos por loco (Ae) nas três raças de búfalos de rebanhos brasileiros.

		Raça			Média
		Mediterrâneo	Jafarabadi	Murrah	
Loco CSSM054	N	29	27	29	28,33
	A	4	3	3	3,33
	Ae	4,11	1,65	1,38	2,38

O número efetivo de alelos (Ae) nas raças Jafarabadi (1,65) e Murrah (1,38) foi menor que o número médio de alelos por loco (A), enquanto na raça Mediterrâneo (4,11) manteve-se próximo ao número médio de alelos observados (quatro), com média de 2,38 alelos/loco. O fato dos números efetivos de alelos nas raças Jafarabadi e Murrah apresentarem-se menores que a média de alelos por loco indicou que alguns alelos são raros (frequências menores que 5%). De fato, dois alelos nesse loco tiveram frequências maiores que 25% (alelo quatro e três) e os alelos dois e um tiveram frequências menores que 10%. Nas raças Jafarabadi, o alelo dois (0,055) e na raça Murrah, o alelo um (0,034) podem ser considerados raros com frequência menor igual a 5% (Tabela 5).

5.3.2 Estrutura genética

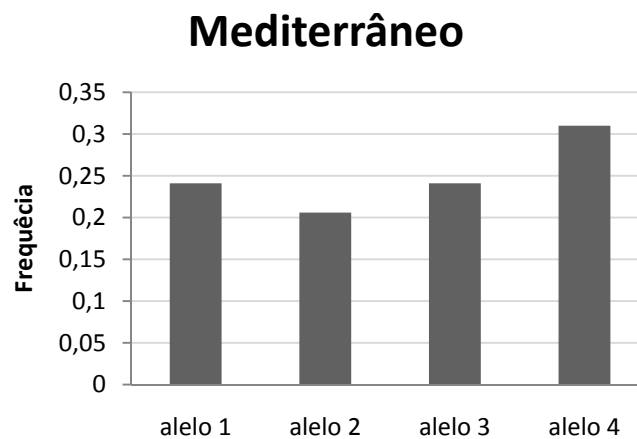
5.3.2.1 Loco CSSM054

A distribuição das frequências alélicas neste loco (Tabela 5) foi mais homogênea na raça Mediterrâneo (0,206 a 0,310) quando comparada às raças Jafarabadi (0,055 a 0,759) e Murrah (0,034 a 0,844).

Tabela 5. Alelos no loco CSSM054 e suas respectivas frequências estimadas para as raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah.

Loco	Alelo	Raça			Média
		Mediterrâneo	Jafarabadi	Murrah	
CSSM054	4	0,310	—	—	0,310
	3	0,241	0,759	0,844	0,615
	2	0,206	0,055	0,120	0,127
	1	0,241	0,185	0,034	0,153

Nas raças Murrah e Jafarabadi, o alelo três foi o mais frequente (0,844 e 0,759, respectivamente), enquanto que na Mediterrâneo o alelo mais frequente foi o quatro (0,310). Dos quatro alelos encontrados para este loco, um foi exclusivo da raça Mediterrâneo (alelo quatro), indicando especificidade desse alelo para a raça Mediterrâneo (Figura 6).



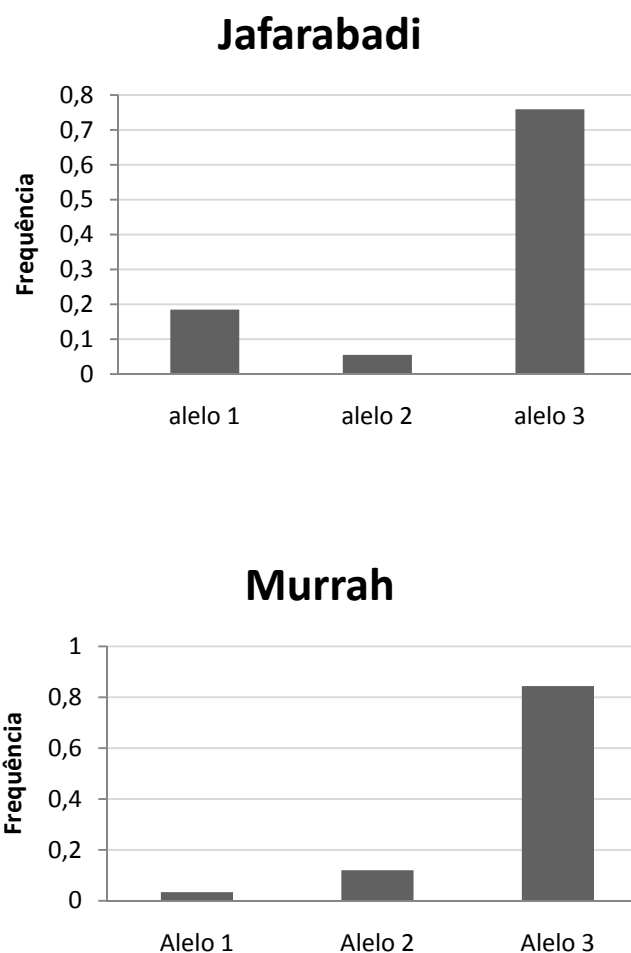


Figura 6: Distribuição das frequências dos alelos no loco CSSM054 nas raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah.

Na raça Mediterrâneo, o genótipo mais frequente foi 2/4, nas raças Jafarabadi e Murrah, o genótipo 3/3 (Figura 7). Um fato interessante observado foi o compartilhamento do mesmo genótipo (3/3) entre as três raças de búfalos.

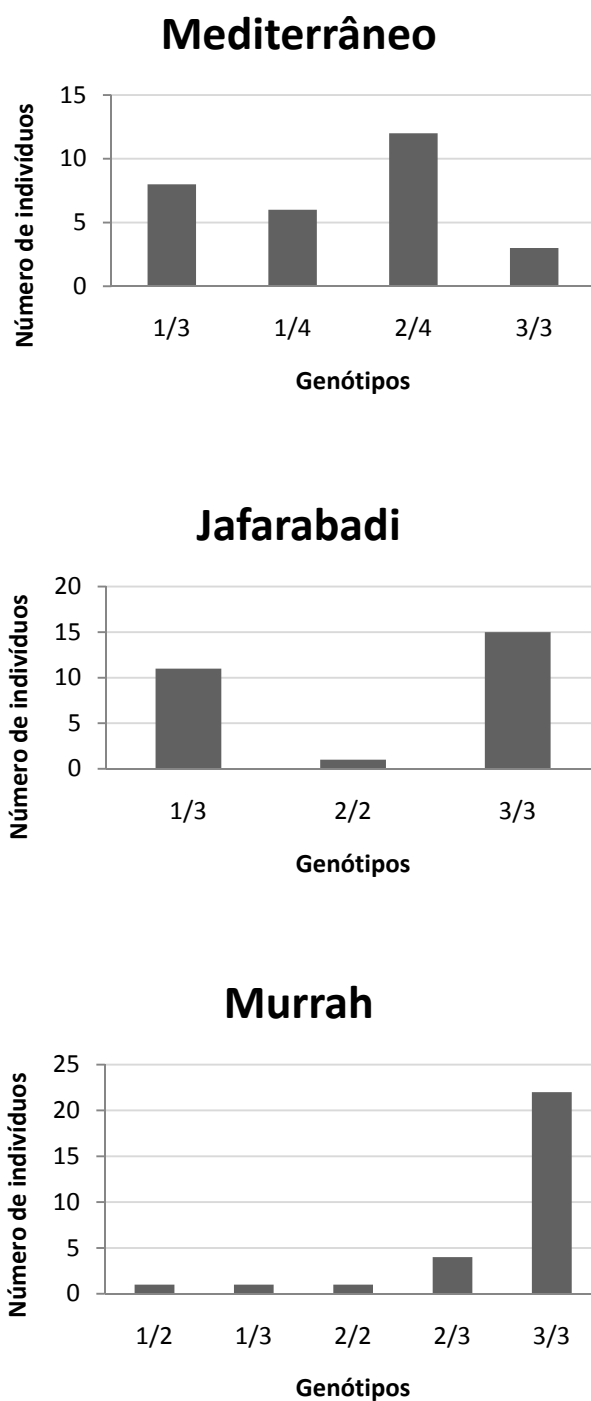


Figura 7. Número de indivíduos e genótipos encontrados no loco CSSM054 nas raças Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah.

5.3.2.2 Heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He)

Na Tabela 6, apresentam-se os valores da heterozigosidade observada (Ho), esperada (He) e média para o loco CSSM054 nas três raças de búfalos.

A Ho média foi igual a 0,503, variando de 0,206 para a raça Murrah a 0,896 para a raça Mediterrâneo. Nas raças Mediterrâneo e Jafarabadi, a Ho foi maior que a He, indicando excesso de heterozigotos, enquanto que na raça Murrah foi inferior a He, apresentando elevado número de indivíduos homozigotos, portanto, baixa variabilidade genética. Vários fatores podem contribuir para a ocorrência de um valor de Ho inferior a He em uma população, como endogamia, subdivisão da população em linhagens, presença de alelo nulo - quando o alelo não pode ser amplificado por PCR, devido, principalmente, a uma mutação no sítio de pareamento do primer, por isso um dos alelos não se amplifica, sendo o indivíduo classificado como homozigoto (DAWSON et al., 1997)e, ainda, presença de seleção, que pode estar ocorrendo a favor de homozigotos (MAUDET et al., 2002b).

A He média foi igual a 0,475, variando de 0,275 para a raça Murrah, 0,393 para a raça Jafarabadi a 0,757 para a raça Mediterrâneo, sendo que apenas na raça Mediterrâneo o valor de He foi superior a 70%. Segundo Ott (1992) um loco altamente polimórfico apresenta He maior que 70%, portanto pode-se considerar que o loco CSSM054 é altamente polimórfico para a raça Mediterrâneo.

Tabela 6. Heterozigosidade observada (Ho) e Heterozigosidade esperada (He) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco CSSM054.

Raças	Loco CSSM054	
	Ho	He
Mediterrâneo	0,896	0,757
Jafarabadi	0,407	0,393
Murrah	0,206	0,275
Média	0,503	0,475

Os valores encontrados para H_e , foram inferiores aos relatados por Albuquerque (2005) em estudos de diversidade genética em 382 búfalos de cinco raças (Mediterrâneo, Jafarabadi, Murrah, Carabao e Baio) utilizando 13 marcadores microssatélites derivados de bovinos onde obteve heterozigosidade média variando de 0,200 a 0,856 e por Mishra et al. (2009), que encontraram heterozigosidade média de 0,572 para a raça Banni e 0,610 para raça Murrah quando caracterizaram 95 animais dessas 2 raças utilizando 24 marcadores microssatélites. Porém, estes resultados foram superiores aos valores obtidos por Moioli et al. (2001) quando compararam populações de búfalos da Itália e da Grécia, onde encontraram heterozigosidade média de 0,167 e 0,177 para as duas populações, respectivamente.

A raça que apresentou maior diversidade genética foi a Mediterrâneo. Esse resultado pode estar refletindo o fato do grupo ser o mais numeroso entre os demais, apresentando a maior população no País, como também a provável introdução de material genético de outras raças.

Os menores índices de diversidade encontrados nas raças Jafarabadi e Murrah podem ser atribuídos, no caso da raça Jafarabadi, a uma possível base genética estreita, com rebanhos endogâmicos, e no caso da raça Murrah a uma possível pressão de seleção a que vem sendo submetida em programas de melhoramento genético. No entanto, essa análise foi submetida em uma amostragem baixa não sendo aconselhável fazer inferências.

Na Tabela 7, podem-se observar os valores do teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para o loco CSSM054 por raça. Os resultados sugerem que, exceto a raça Murrah, os resultados foram significativos ($p < 0,05$) para as demais raças, Mediterrâneo e Jafarabadi e, portanto, as frequências alélicas não encontram-se em equilíbrio para esse loco.

O desvio às condições de equilíbrio é um grande indicador de não-estruturação da população, quer na proporção entre heterozigoto e homozigoto, segundo o modelo de Hardy-Weinberg, quer no equilíbrio de ligação entre os pares de locos. Segundo

Hartl & Clark (2007), a redução no número de heterozigotos relativamente ao esperado em condições de EHW pode ser consequência de não estruturação da população.

Tabela 7. Probabilidades obtidas para verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e valor de p nas três raças de búfalos de rebanhos brasileiros.

Loco CSSM054			
	Mediterrâneo	Jafarabadi	Murrah
	42,22	28,94	4,19
p	*0,000000	*0,000002	0,2415

* $p < 0,05$ (significativo)

Há vários fatores para esse cenário de desvio de EHW que podem levar à deficiência de heterozigotos incluindo a presença de alelos nulos, acasalamentos sem critérios conduzidos pelos criadores, o efeito Wahlund - subdivisão da população (raça) em subpopulações (rebanho), seleção contra heterozigotos, endogamia ou uma combinação destes. Alelos nulos são alelos que não são amplificados e são comumente relatados em estudos de microssatélites como sendo a fonte de déficit de heterozigosidade (PEMBERTON et al., 1995).

5.4.2. Diferenciação genética entre as raças e entre os pares de raças (Índice de fixação)

De acordo com as estatísticas de Weir & Cockerham (1984), foram estimados os índices Theta e f . O parâmetro Theta se refere ao índice F_{ST} e reflete a proporção da variabilidade genética encontrada entre populações, ou de acordo com Hartl & Clark (2007), é uma medida da autozigose devido à estruturação. O parâmetro f ou F_{IS} reflete os desvios de panmixia na população, ou seja, é uma estimativa da endogamia dentro das raças. Segundo Murray (1996), quando há excesso de heterozigotos, consequentemente a medida da endogamia é negativa. Isso pode ser devido a dois

fatores principais: à presença de alelo deletério ou gene letal e à predominância de cruzamento exogâmico (geralmente entre os indivíduos de diferentes subpopulações). Quando há excesso de homozigotos, em consequência, a medida da endogamia é positiva. Isso se deve entre outras possibilidades a dois fatores: que o loco em estudo esteja sob seleção; ou que a endogamia seja prática comum na população.

Na Tabela 8 estão as médias de f e Theta para o loco polimórfico, indicando valores de 0,06 e 0,21, respectivamente. Essas estimativas indicam homozigose de 6% e diferenciação média de 21% entre as três raças.

Tabela 8. Valores de f e Theta para o loco CSSM054 considerando as três raças de búfalos comerciais de rebanhos brasileiros.

Loco	f (F_{IS})	Theta (F_{ST})
CSSM054	0,06 (0,0030- 0,1767)	0,21 (0,0873 -0,4177)

() Intervalo de confiança de 95%

Segundo parâmetros de Nei (1978), a estrutura genética das três raças é determinada como sendo alta (Theta > 0,15). Assim, o valor médio de Theta (0,21) em relação ao loco polimórfico estaria relacionado a uma alta estruturação genética, ou seja, uma subdivisão entre elas, devido a um provável isolamento reprodutivo. No entanto, esta estimativa apresentou intervalo de confiança muito amplo (0,0873 – 0,4177), indicando a fragilidade dos dados, o que não ocorreu com o intervalo de f , portanto com maior confiabilidade. Kumar et al. (2006) encontraram valores de Theta inferiores ao deste trabalho (variando entre 0,75% e 6%) quando analisaram a diferenciação genética de oito raças de búfalos indianos, sendo esse valor explicado pela subdivisão de populações dentro das raças.

Na Tabela 9, observa-se os valores de Theta para as combinações entre as raças. Quando esta estimativa é feita entre duas raças, pode ser considerada uma medida da distância genética. A significância dos valores de Theta foi testada por

permutação com intervalos de confiança de 95%. Todos os valores de Theta obtidos para os pares de raças apresentaram amplo intervalo, indicando fragilidade da estimativa. Os valores encontrados para Theta foram considerados próximos e também altos, 0,21, entre as raças Jafarabadi e Murrah; 0,22 entre as raças Mediterrâneo e Jafarabadi e 0,24 entre as raças Mediterrâneo e Murrah.

Portanto, como o maior valor foi observado entre as raças Mediterrâneo e Murrah, considera-se que estas raças apresentem uma alta estruturação genética, resultado semelhante ao relatado por Albuquerque (2005) quando afirmou que a estruturação encontrada nessas raças pode ser devido a possíveis cruzamentos a que elas foram submetidas no passado.

Tabela 9. Valor de Theta para o loco CSSM054 considerando as raças duas a duas (Pairwise F_{ST}).

Pares de raças	Theta (F_{ST})
Mediterrâneo X Jafarabadi	0,22 (0,0705-0,4665)
Mediterrâneo X Murrah	0,24 (0,0837-0,4714)
Jafarabadi X Murrah	0,21 (0,0228-0,5730)

() Intervalo de confiança a 95%

5.4.3. Conteúdo de informações polimórficas (PIC)

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) mostrados na Tabela 10, evidenciam que o PIC variou de 0,250 (raça Murrah) a 0,697 (raça Mediterrâneo). A raça Mediterrâneo apresentou valor de PIC acima de 50% podendo considerar o loco CSSM054 altamente informativo para essa raça, enquanto que nas raças Jafarabadi e Murrah foi considerado moderadamente informativo, com PIC menor que 0,5 e maior que 0,25, segundo critérios de Botstein et al. (1980).

Tabela 10. Valores de PIC para o loco CSSM054 nas três raças de búfalos de rebanhos brasileiros.

Raça	Loco
	CSSM054
Mediterrâneo	0,697
Jafarabadi	0,331
Murrah	0,250
Média	0,426

O valor médio de PIC foi inferior ao relatado por Kathiravan et al. (2010), de 0,669 quando avaliaram a diversidade genética em 48 búfalos da raça Kanarese do sul da Índia. No entanto, quando se comparou o valor de PIC por raça, Saif et al. (2011), encontraram valores semelhantes aos obtidos neste estudo quando analisaram as raças paquistanesas Nili-Ravi e Kundi utilizando nove microssatélites obtiveram valor máximo de PIC (0,72) para o loco ILSTS029 e valor mínimo para o loco CSSM66 (0,42) para a raça Kundi.

6. CONCLUSÕES

Dos quatro locos microssatélites específicos para búfalos utilizados neste trabalho, apenas o loco CSSM054 foi polimórfico, os locos MB099 e BL41 foram monomórficos e o loco IDVGA-53 não apresentou amplificação com o DNA extraído.

Raça Mediterrâneo

- Apresentou quatro alelos e o alelo quatro foi exclusivo, portanto apresentando especificidade para essa raça;
- Apresentou excesso de heterozigotos indicando alta variabilidade genética;
- O valor do conteúdo de informações polimórficas (PIC) revelou que o loco CSSM054 foi altamente informativo para essa raça.

Raça Jafarabadi

- Apresentou três alelos;
- Apresentou excesso de heterozigotos, no entanto a variabilidade genética foi baixa.
- O valor do conteúdo de informações polimórficas (PIC) revelou que o loco CSSM054 foi moderadamente informativo para essa raça.

Raça Murrah

- Apresentou três alelos;
- Apresentou excesso de homozigotos, indicando provável endogamia e baixa variabilidade genética;
- O valor do conteúdo de informações polimórficas (PIC) revelou que o loco CSSM054 foi moderadamente informativo para essa raça.

As três raças (Mediterrâneo, Jafarabadi e Murrah) apresentaram alta estruturação populacional;

Porém devido ao amplo intervalo de confiança podemos concluir apenas que há evidências de que as três raças diferem entre si.

Devido à fragilidade e imparcialidade da técnica de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida mais estudos devem ser realizados com os marcadores microssatélites analisados neste estudo, utilizando uma técnica mais confiável como a genotipagem em sequenciador automático a fim de se obter resultados mais precisos.

7. REFERÊNCIAS

- ABCB. **Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos**. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/>. Acesso em: 15 de Setembro de 2010.
- ALMEIDA, S.E.M. et al. Genetic diversity in a Brazilian bovine herd based on four microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.347-350, 2000.
- ANDRADE, V.J.; GARCIA, S.K. Padrões raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, p.39-45, 2005.
- ALBUQUERQUE, M.S.M. **Marcadores moleculares e variabilidade genética em búfalos do Brasil**. 2005. 87p. Tese (Doutorado em Genética) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- ALBUQUERQUE, M.S.M. et al. Variabilidade genética em búfalos estimada por marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.623-628, 2006.
- AMARAL M.E, et al. Construction of a river buffalo (*Bubalus bubalis*) whole-genome radiation hybrid panel and preliminary RH mapping of chromosomes 3 and 10. **Animal Genetics**, v.38, p. 311-314, 2007.
- AMARAL, M.E, et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1-11, 2008.
- BALASUBRAMANIAN, S.P.; COX, A.; BROWN, N.J.; REED, M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, v.30, p.593-601, 2004.
- BARKER, J.S.F.A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5th. **Proceedings...** Guelph: International Committee for World Congresses on Genetics Applied to Livestock Production, 1994. v. 5, p. 501-508.

BHATIA, S.; ARORA, R. Genetic characterization and differentiation of Indian sheep breeds using microsatellite marker information. **Korean Journal of Genetics**, v. 29, p. 297–306, 2007.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 293-298, 2007.

BERTHOULY et al. Genetic and morphometric characterization of a local Vietnamese Swamp Buffalo population. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.127, p. 74-84, 2010.

BORGHESE, A. Buffalo production and research – FAO Regional Office for Europe, REU Technical Series 67, Rome, 321p, 2005.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, n.32, p.314-331, 1980.

BRONDANI, R.P.V.; GAIOTO, F.A.; MISSIAGGIA, A.A.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Mol. Ecol. Not.**, v. 3, n. 2, p.177 - 179, 2003.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N.J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, v.28, p.1040-1050, 2006.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica**, 20, p.1-11, set. 2003.

CALVO, J.H. et al. Fine mapping of genes of sheep chromosome 1 and their association with milk traits. **Animal Genetics**, v. 37, p. 205-210, 2006.

CALVO, J.H. et al. Isolation, mapping and identification of SNPs for four genes (ACP6, CGN, ANXA9, SLC27A3) from a bovine QTL region on BTA3. **Cytogenetic and Genome Research**, 114, 39–43, 2006a.

CHEN, Y.C.; LI, X.H. New evidence of the origin and domestication of the Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Journal**, v.1, p.51-55, 1989.

CIAMPI, A. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e sequenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado.**1999. 204 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999

COCKRILL, W.R. The water buffalo: a review. **The British Veterinary Journal**, v.137, p.8-16, 1981.

CPATU – Embrapa Amazônia Oriental Rebanho bubalino. Disponível em: www.cpatu.embrapa.br/servicos/consultorias/carne-de-sol-de-baby-bufalo/?searchterm=carne. Acesso em: 16 de dezembro de 2010.

CPATU – Embrapa Amazônia Oriental Rebanho bubalino. Disponível em: www.cpatu.embrapa.br/noticias/2007/agosto/2a-semana/baby-bufalo-bufalo-precoce-e-bufalo-superprecoce-tem-produtividades-elevadas/?searchterm=carne, 2007. Acesso em: 16 de dezembro de 2010.

DIAS-SALMAN, A.K. et al. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v.10, n.2, ISSN 1695-7504, 2009. Disponível em: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209.html>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2011.

DODDS, K.G.; TATE, M.L.; McEWAN, J.C. et al. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.966-975, 1996.

EISEN, J.A Mechanistic basis for microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D. B et al. (Ed.) **Microsatellites – evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, p. 34 – 48, 1999.

EL NAHAS, S.M.; DE HONDT, H.A.; WOMACK, J.E. Current status of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) gene map. **The Journal of Heredity**, v.92, p.221-225, 2001.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Genetics Reviews**, v.5, p.435-445, 2004.

EVERTS-VAN DER WIND, A.E. et al. Gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. **Genome Research**, v.14, p.1424-1437, 2004.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Edinburg: Longman Group Limited, 1996. 464p.

FAO. **Secondary guidelines for development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers**. Rome: FAO. 2004.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Faostat agriculture data. Disponível em: <http://faostat.fao.org/> Acesso em: Fevereiro de 2011.

FERREIRA, M.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220p.

FRANK, M.T. et al. Homogeneity of recombination rate within a conserved region on BTA3 that contains QTL. **Animal Genetics**, v.33, p.56-60, 2002.

GAMA, L.T. Manutenção da variabilidade genética em programas de seleção. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS (RAÇAS NATIVAS PARA O SEMI-ÁRIDO) **Anais...** Recife, PE, 2004. p.38-44.

GARGANI, M. et al. Genetic variation and relationships among Turkish water buffalo Populations. **Animal Genetics**, v.4, p.93-96, 2009.

GIACOMONI, E.H. **Variabilidade genética em duas raças de eqüinos (*Equus caballus* – Equidae) – Crioulo e Pantaneiro – Avaliada através do marcador de**

DNA microssatélite. Porto Alegre, 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GOLDAMMER, T. et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 7 and comparative mapping to the cattle and human genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.119, p.235-241, 2007.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

HARTL D.L.; CLARK, A.G. Principles of population genetics. 4rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2007. 565 p.

HEYEN, D.W. et al. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **American Physiological Society**, v.1, p.165-75, 1999.

HOLSINGER, K.E.; LEWIS, P.O. Hickory: A Package for Analysis of Population Genetic Data. Ver. 1.0.4. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, CT, 2006. Available via <http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory/hickory.html>

IANELLA, P. et al. First radiation hybrid map of the river buffalo X chromosome (BBUX) and comparison with BTAX. **Animal Genetics**, v.39, p.196-200, 2008.

IANNUZZI, L. et al. Standard karyotype of the river buffalo (*Bubalus bubalis* L., 2n=50). Report of the committee for the standardization of banded karyotypes of the river buffalo. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.67, p.102-13, 1994.

IANNUZZI, L. et al. The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 102, p. 65-75, 2003.

IANNUZZI, L.; DI MEO, G. Water Buffalo. In: COCKETT, N.E.; KOLE, C., Editors. **Genome Mapping and Genomics in Domestic Animals**. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 2009.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Agropecuário 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>. Acesso em: 14 de outubro de 2010.

IHARA, N. et al. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellite. **Genome Research**, v.14, p.1987-1998, 2004.

IORIO, M.; VINCENTI, D.; ANNUNZIATA, M. et al. Biochemical and molecular investigations on qualitative and quantitative Hb polymorphism in the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) population reared in Southern Italy. **Genetic and Molecular Biology**, v.27, p.167-173, 2004.

KATHIRAVAN, P. et al. Short tandem repeat based analysis of genetic variability in Kanarese buffalo of south India. **GenetiKa**, v. 46, n. 8, p. 1108-1114, 2010.

KHATKAR, M.S.; THOMSON, P.C.; TAMMEN, I. & RAADSMA, H.W. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. **Genetics Selection Evolution**, v.36, p.163-190, 2004.

KIERSTEIN, G. et al. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.30, n.2, p.308-324, 2004.

KIM, K.S. et al. Cross-species amplification of bovidae microsatellites and low diversity of the endangered korean goral. **The Journal of Heredity**, v.95, n.6, p.521-525, 2004.

KUMAR, S. et al. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. **Molecular Ecology**, v.15, n.3, p.593-600, 2006.

LENSTRA, J.A.; BRADLEY, D.G. Systematics and phylogeny of cattle. **The Genetics of Cattle**, CAB International, New York, pp. 1–14, 1999.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. GDA – Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. Disponível em: <<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>>. 2000.

LOFTUS, R.T.; MACHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G. et al. Evidence for two independent domestications of cattle. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA***, v.91, p.2757-2761, 1994.

MACHUGH, D.E.; SHIVER, M.D.; LOFTUS, R.T. et al. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos Taurus* and *Bos Indicus*). ***Genetics***, v.146, n.3, p.1071-1086, 1997.

MARQUES, J.R.F.; COSTA, M.R.; EGITO, A.A. et al. Conservation of genetic resources of the small populations of domestic animal of the Amazon Region in Brazil. ***Animal Genetic Resources Information***, Roma, v.33, p.31-40, 2003.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: IV SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL. ***Anais...*** Campo Grande-MS, 2002.

MAUDET, C. et al. Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex* (ibex)]. ***Molecular Ecology***, Oxford, v. 11, n. 3, p. 421-436, 2002b.

MICHELIZZI, V.N. et al. Water buffalo genome science comes of age. ***International Journal of Biological Sciences***, v.6, p.333-349, 2010.

MISHRA, B.P.; KATARIA, R.S.; BULANDI, S.S. et al. Riverine status and genetic structure of Chilika buffalo of Eastern India as inferred from cytogenetic and molecular marker based analysis. ***Journal of Animal Breeding and Genetics***. v.126, p.69-79, 2008.

MISHRA, B.P.; KATARIA, R.S. et al. Evaluation of genetic variability and mutation drift equilibrium of banni buffalo using multi locus microsatellite markers. **Tropical Animal Health and Production**, v.41, p.1203-1211, 2009.

MIZIARA, M.N, et al. A radiation hybrid map of river buffalo (*Bubalus bubalis*) chromosome 1 (BBU1). **Cytogenetic and Genome Research**, v.119, n.1-2, p.100-104, 2007.

MOIOLI, B.; GEORGOUDIS, A.; NAPOLITANO, F.; et al. Genetic diversity between Italian and Greek buffalo populations. **Animal Genetic Resources Information**, v.29, p.31–40, 2001.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654-660, 1991.

MOORE, S.S.; EVANS, D.; BYRNE, K.; BARKER, J.S. F.; TAN, S.G.; VANKAN, D.; HETZEL, D.J.S. A set of polymorphic DNA microsatellites useful in swamp and river buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, Oxford, Inglaterra, v. 26, p. 355-359, 1995.

MOREIRA, P.; COSTA, A.L.; VALENTIN, J.F. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagens cultivadas em terra firme, no Estado do Acre. **Embrapa-CPAF**, p.19, 1994.

MURRAY, B.W. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. McMaster University, 1996. Disponível em: <helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>. Acesso em: 19 out. 2010.

NAGARAJAN, M. et al. Microsatellite markers of water buffalo, *Bubalus bubalis* - development, characterisation and linkage disequilibrium studies. **BMC Genetics**, v.10, p.68, 2009.

NAVANI, N. et al. A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Genetics**, v.33, n.2, p.149-154, 2002.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> Acesso em: 17 de Setembro de 2010.

OLIVEIRA, J.F.S. Curso de bubalinocultura. 1995. Apostila.

OLIVEIRA, E.J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLSEN, H.G. et al. A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production in Norwegian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.3124-3130, 2002.

OLSSON, M.L.; IRSHAID, N.M.; HOSSEINI-MAAF, B. et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. **Blood**, v.98, n.5, p.1585-1593, 2001.

O'RYAN C, HARLEY E.H, BRUFORD M.W et al. Microsatellite analysis of genetic diversity in fragmented South African buffalo populations. **Animal Conservation**, v.1, p.85–94, 1998.

OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **American Journal of Human Genetics**, v.51, p.283-290, 1992.

PAUCIULLO, A. et al. Sequence analysis and genetic variability of stearoyl CoA desaturase (SCD) gene in the Italian Mediterranean river buffalo. **Molecular and Cellular Probes**. v.24, p.407-410, 2010.

PEMBERTON, J.M. et al. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology**, v.4, n.2, Apr, p.249-252, 1995.

PEREIRA, J.C.C. Melhoramento genético aplicado à produção animal. Belo Horizonte: editora FEP-MVZ, v.1.p.609, 2004.

PLANTE, Y. et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on 10 chromosomes in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1516-24, 2001.

R Development Core Team (2011): A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, U. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

RAFALSKI, J.A.; MORGANTI, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIERREN, B. et al. (Ed.). **Analysis of Non-mammalian Genomas: a practical guide**. New York: Academia Press, p. 75-134, 1996.

RODRIGUES-FILHO, E.A. et al. Mapping MHC genes in river buffalo. **Animal Genomics for Animal Health**, v.132, p.343-346, 2008.

ROGBERG-MUÑOZ, A. et al. Cross-specific multiplexed microsatellite set for Brazilian buffalo identification. In: 9TH Buffalo World Congress, Buenos Aires – Argentina. **Rev. Vet.** v.21, Sup. 1, pp.358-361, 2010.

ROTH, J.; MYERS, P. *Bubalus bubalis* 2004
http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Bubalus_bubalis.html.

ROUT, P.K.; JOSHI, M.B.; MANDAL, A. et al. Microsatellite based phylogeny of Indian domestic goats. **BMC Genetics**, v.9, p.11, 2008.

SAIF, R. et al. DNA fingerprint of Pakistani buffalo breeds (Nili-Ravi, Kundi) using microsatellite and cytochrome b gene markers. **Molecular Biology Reports**, DOI 10.1007/s11033-011-0808-0, 2011.

SANTOS A., et. al. Comparison of methods of DNA extraction for real-time PCR in a model of pleural tuberculosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118(1), p. 60-65, 2009.

SANGUINETTI, C.J.; NETO, E.D.; SIMPSON, A.J.D. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.209-221, 1994.

SCHULMAN, N.F. et al. Quantitative trait loci for health traits in finnish Ayrshire Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.443-9, 2004.

SENA, L. et al. Polymorphisms in MHC-DRA and –DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. **Animal Genetics**, v.34, p.1-10, 2003.

SENO, L.O.; CARDOSO, V.L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.2016-2022, 2007.

SILVA, M.S.T. et al. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores. **PRONAF**. Agosto 2003.

SODHI, M.; MUKESH, M.; AHLAWAT, S.P.S. et al. Genetic diversity and structure of two prominent zebu cattle breeds adapted to the arid region of India inferred from microsatellite polymorphism. **Biochemical Genetics**, v.46, p.124–136, 2008.

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

STAFUZZA N.B, et al. Preliminary radiation hybrid map for river buffalo chromosome 6 and comparison to bovine chromosome 3. **Animal Genetics**, v.38, p.406-409, 2007.

STAFUZZA N.B, et al. Comparative RH maps of the river buffalo and bovine Y chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v.126, p.132-138, 2009.

STAFUZZA, N.B. **Construção de uma biblioteca BAC e avaliação de marcadores para caracterização de regiões alvo do genoma do búfalo**. 2010, 142p. Tese

(Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SUBRAMANIAN, S. et al. Triplet repeats in human genome: distribution and their association with genes and other genomic regions. **Bioinformatics**, v.19, n.5, 2003a.

SUN, H.S.; KIRKPATRICK, B.W. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species. **Mammalian Genome**, v.7, p.128-132, 1996.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, p. 832 - 837, 1994.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p.967-981, 2000.

USDA AGRICULTURE HANDBOOK Nº8 USDA AGRICULTURE HANDBOOK. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/ref/USDApubs/aghandbk.htm>. Acesso em: jul. 2010.

VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana após o parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, p.63-73, 2005.

VENÂNCIO, L.P.R. **Isolamento e caracterização de microssatélites em búfalo de rio (*Bubalus bubalis*) a partir da construção de bibliotecas genômicas parciais com hibridização seletiva**. 2008. 85p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

VIEIRA, J.N. et al. Evaluation of the panel of 14 microsatellites in testing individual identity and parentage verification in Murrah buffaloes raised in Brazil. In: 32nd Conference of the International Society for Animal Genetics, *Proceedings ...* v. 1. p. 71-71, 2010.

VIJH, R.K.; TANTIA, M.S.; MISHRA, B. et al. Genetic relationship among buffalo breeds of India. **Indian Journal of Animal Sciences**. v.78, p.378–383, 2008a.

VIJH, R.K.; TANTIA, M.S.; MISHRA, B.; BHARANI KUMAR, S.T. Genetic relationship and diversity analysis of Indian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Animal Science**, v.86, p.1495-1502, 2008b.

WEIR, B.S. Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, **Inc. Publishers**. 1996.

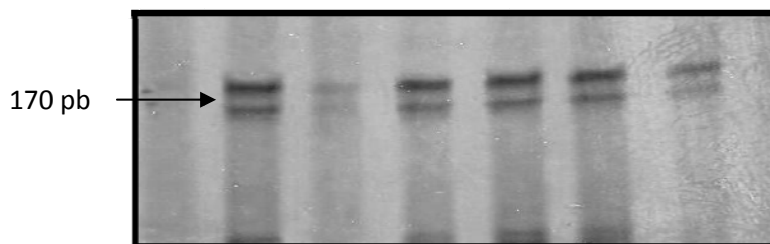
WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

YINDEE, M, et al. Y-chromosomal variation confirms independent domestications of swamp and river buffalo. **Animal Genetics**, v. 41, n.4, p.433-435, 2010.

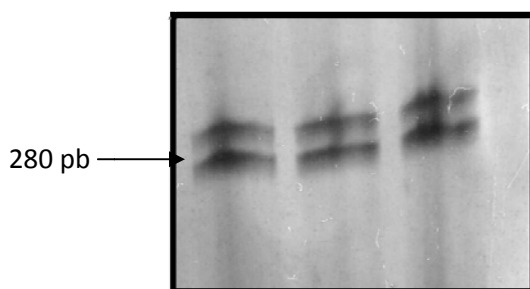
ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.1-16, 2002.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

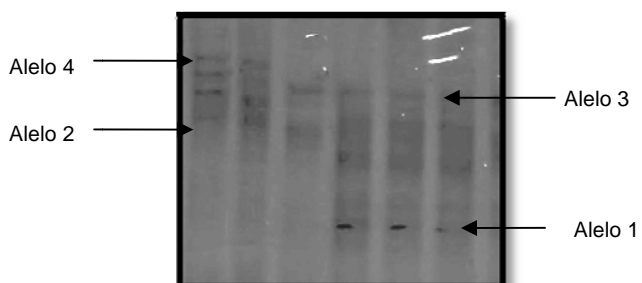
APÊNDICE 1



Apêndice 1A. Eletroforograma de gel de poliacrilamida desnaturante 10% mostrando resultado representativo do padrão de bandas do loco MB099 para os 90 animais genotipados.



Apêndice 1B. Eletroforograma de gel de poliacrilamida desnaturante 10% mostrando resultado representativo do padrão de bandas do alelo do loco BL41 para os 90 animais genotipados.



Apêndice 1C. Eletroforograma de gel de poliacrilamida desnaturante 10% mostrando resultado representativo do padrão de bandas dos alelos do loco CSSM054 para os 90 animais genotipados.