



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA



ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES CAPRINAS LOCAIS E EXÓTICAS
ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

LAURA LEANDRO DA ROCHA

Recife – PE
2009

LAURA LEANDRO DA ROCHA

**ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES CAPRINAS LOCAIS E EXÓTICAS
ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará e Universidade Federal da Paraíba – como requisito para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Orientadora: Maria Norma Ribeiro, D. SC.

Co-Orientadores: Juan Vicente Delgado

Amparo Martínez Martínez

LAURA LEANDRO DA ROCHA

**ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES CAPRINAS LOCAIS E EXÓTICAS
ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Tese defendida e aprovada em 25 de Novembro de 2009.

Orientadora:

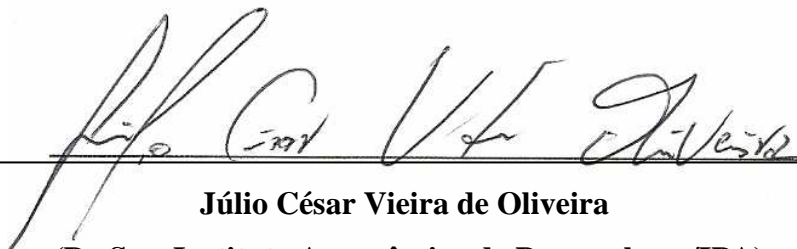


Prof.^a Maria Norma Ribeiro

(Dr.Sc – UFRPE)

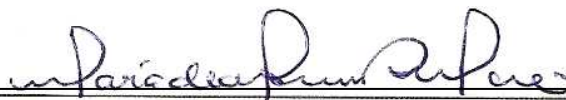
Banca Examinadora:

Diana Magalhães de Oliveira (Dr.Sc – UECE)

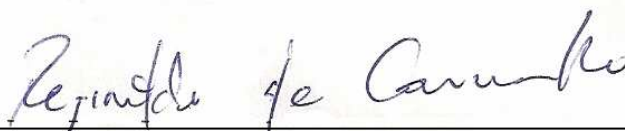


Júlio César Vieira de Oliveira

(Dr.Sc – Instituto Agronômico de Pernambuco/IPA)



Maria de Mascena Diniz Maia (Dr. Sc – UFRPE)



Reginaldo de Carvalho (Dr.Sc - UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Aos criadores de caprinos locais, verdadeiros conservacionistas e mestres na arte de conhecer o Sertão Nordestino.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, CAPES e ao Departamento de Genética da Universidade de Córdoba, pelo apoio financeiro e desenvolvimento da pesquisa.

À professora Maria Norma Ribeiro, pelo apoio, amizade e incentivo. Aos pesquisadores Amparo Martínez Martínez e José Luis Veja-Pla pelo incentivo, amizade e determinação. Ao professor Juan Vicente Delgado pelo incentivo as pesquisas na área da Conservação de Recursos Zoogenéticos e vínculos como países da América Latina.

A Vilma e Teodorico Alves pelo carinho, acolhimento, amizade, aprendizado e amor. A Marcio e Grace pela amizade e força nos momentos tristes. Aos meus amigos espanhóis, brasileiros e italianos: Joaquim, José Manoel, aos amigos da Diputación, Elisa, German, Raquel, Laura, Manuela, Plinia Maria, pelo companheirismo e alegria.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

A presente tese está composta de uma Introdução geral e mais três capítulos a serem enviados para publicação: “Desenvolvimento de um painel de microssatélites para teste de paternidade em caprinos” (*Capítulo I*), “Diversidade e estrutura genética de populações caprinas locais brasileiras e exóticas” (*Capítulo II*) e “Uso de inferência clássica e bayesiana para análise das relações genéticas e estudo da estrutura genética de populações caprinas através de marcadores microssatélites” (*Capítulo III*).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO I.	44
RESUMO.....	46
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1. <i>Material biológico</i>	50
2.1. <i>Extração do DNA e reação de amplificação dos microssatélites</i>	51
2.3. <i>Microssatélites analisados</i>	51
2.4. <i>Amplificação do DNA pela técnica da PCR</i>	53
2.5. <i>Preparação dos géis e seqüenciamento dos fragmentos amplificados</i>	53
2.6. <i>Análise estatística</i>	55
3. RESULTADOS.....	56
4. DISCUSSÃO.....	63
5. CONCLUSÃO.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
6.1. <i>Referências da Web</i>	73
CAPÍTULO II	75
RESUMO.....	77
1. INTRODUÇÃO.....	79
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1. <i>Análise estatística</i>	83
2.1.1. <i>Método de Agrupamento e Análise da estrutura populacional</i>	85
3. RESULTADOS.....	87
3.1. <i>Número de alelos, Heterozigosidade Observada, Esperada e estatística F</i>	87
3.2. <i>Diferenciação genética entre as populações</i>	91
3.3. <i>Efeito de gargalo genético (Bottleneck) em caprinos locais</i>	93
3.4. <i>Estrutura populacional</i>	94

4. DISCUSSÃO.....	98
5. CONCLUSÃO.....	104
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
6.1. Referências da Web.....	113
CAPÍTULO II.	114
RESUMO.....	116
1. INTRODUÇÃO.....	118
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1. <i>Amostra animal e microssatélites analisados</i>	120
2.2. <i>Análise estatística.</i>	120
3. RESULTADOS.....	123
3.1. Distâncias Genéticas.....	123
3.2. Designação de indivíduos às respectivas populações de origem.....	130
4. DISCUSSÃO.....	137
5. CONCLUSÃO.....	142
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXO.....	150

LISTA DE ABREVIATURAS

$(\delta\mu)^2$	Distância de Goldstein
μl	Microlitro
μM	Micromolar
AFLP	Amplified Fragment Length
ALP	Raça Alpina
AMOVA	Análise de Variância Molecular
ANG	Caprino Anglo-Nubiano/raça Anglo-Nubiana
AZUL	Caprino local Azul
BOER	Caprino Boer
CAN	Caprino Canindé
CDB	Convenção sobre Biodiversidade Genética
D	Distância padrão de Nei
D'	Distância Máxima de Nei
D _A	Distância Cavalli-Sforza modificada/Distância de Nei
D _C	Distância de Cavalli-Sforza
ddNTPs	Trifosfato de didesoxirribonucleotídeos
D _m	Distância Mínima de Nei
DMQ	Distância Média Quadrada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D _{Reynolds}	Distância de Reynolds
D _{SW}	Distância Shriver
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAO	Organização para Agricultura e Alimentação
g	Grama
GRAN	Raça Granadina
GRAU	Caprino Graúna
I	Medida de identidade genética
IAM	Modelo de Alelos Infinito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa

M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MARO	Caprino Marota
MCMC	Cadeia de Markov e Simulação Monte Carlo
MG	Caprino Murciano-Granadina
mg	Miligrama
mM	Milimolar
MoDAD	Monitorização da Diversidade dos Animais Domésticos
MOX	Caprino Moxotó
MUR	Caprino Murciano
N_e	Tamanho efetivo populacional
NJ	Neighbor-Joining
OTU	Unidade taxonômica
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PE	Probabilidade de Exclusão
PE_1	Probabilidade de Exclusão Tipo 1
PE_2	Probabilidade de Exclusão Tipo 2
PEC	Probabilidade de Exclusão Combinada
PI	Probabilidade de identidade
PIC	Conteúdo de Informação Polimórfica
RAPD	Amplificação Aleatória de Polimorfismo DNA
REPAR	Caprino Repartido
RFLP	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição
RGA	Recursos Genéticos Animais
SMM	Modelo de Mutação Gradual ou Stepwise
SRD	Caprino Sem Padrão Racial Definido ou Sem Raça Definida
SSR	Sequências Simples Repetidas
T_1	Teste do Sinal
T_2	Teste de Diferenciação Padronizado
T_3	Teste Wilcoxon
TBE	Tampão tris-borato EDTA
UPGMA	Método não balanceado de agrupamento em pares através de média aritmética

Introdução Geral

Figura 1. Grupos de caprinos locais atualmente encontrados no Nordeste brasileiro

Capítulo I. Desenvolvimento de um painel de microssatélites para teste de paternidade em caprinos

Figura 1. Produtos de amplificação multiplex M7

Figura 2. Tipificação dos diferentes alelos presentes em cada um dos microssatélites

Capítulo II. Diversidade e estrutura genética de populações caprinas locais brasileiras e exóticas

Figura 1. Representação gráfica da máxima verossimilhança e sua relação com os valores de k

Figura 2. Designação de indivíduos (A) e de populações (B) usando a estrutura baseada na alocação das amostras para $K=13$. As cores correspondem a cada uma das 14 populações indicadas na Tabela 8. (A) Proporção de indivíduos designados a cada população, cada barra representa uma única amostra individual. (B) Alocação referente às populações caprinas

Capítulo III. Uso de inferência clássica e bayesiana para análise das relações genéticas e estudo da estrutura genética de populações caprinas através de marcadores microssatélites

Figura 1. Árvore não enraizada de distância D_A (Nei et al., 1983) pelo método NJ. A - 23 microssatélites; B- 13 microssatélites

Figura 2. Dendograma referente a Figura 1. A -23 microssatélites; B- 13 microssatélites

Figura 3. Árvore não enraizada de distância de $D_{Reynolds}$ (Reynolds et al., 1983) obtida pelo método NJ. A -23 microssatélites; B- 13 microssatélites

Figura 4. Dendograma referente a Figura 3. A -23 microssatélites; B- 13 microssatélites

Introdução Geral

Tabela 1. Aplicabilidade de alguns métodos disponíveis para a caracterização genética de indivíduos e populações

Tabela 2. Distâncias genéticas, suas características e recomendações para uso em diferentes raças/espécies

Capítulo I. Desenvolvimento de um painel de microssatélites para teste de paternidade em caprinos

Tabela 1. Número de amostras (N) e origem do material biológico (bulbo capilar) das populações estudadas por raça/grupos, região de origem e siglas

Tabela 2. Solução de extração de DNA

Tabela 3. Multiplex com os respectivos microssatélites, sequências direta e reversa, tamanho em pares de base (pb), temperatura de anelamento, fluorocromos e referências

Tabela 4. Componentes para a reação da PCR

Tabela 5. Solução de EDTA, pH = 8 e 0,5M

Tabela 6. Número de alelos (N_a), número de animais (N^a), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Probabilidade de Exclusão (PE_1 e PE_2) em função dos locos analisados

Tabela 7. Prova do EHW para os 27 marcadores nas 10 populações

Tabela 8. Painel de microssatélites para emprego em teste de paternidade, multiplex, tamanho dos alelos e número de alelos (N_a) por locos

Tabela 9. Heterozigosidade esperada (H_e), Probabilidade de identidade (PI) e discriminação ($1/PI$) com o painel exótico

Tabela 10. Heterozigosidade esperada (H_e), Probabilidade de identidade (PI) e discriminação ($1/PI$) das seis populações caprinas brasileiras

Capítulo II. Diversidade e estrutura genética de populações caprinas locais brasileiras e exóticas

Tabela 1. Populações estudadas, número de animais (N), origem do material coletado e siglas

Tabela 2. Número de alelos por locos (N_a), Heterozigosidade Observada (H_o) por locos nas populações

Tabela 3. Número de amostras (N), número médio de alelos (N_a), heterozigosidade média observada (H_o), heterozigosidade média esperada (H_e) e índice de fixação (F_{IS}) dos 14 rebanhos caprinos

Tabela 4. Coeficiente de diversidade genética e estatística F (F_{ST} , F_{IT} e F_{IS})

Tabela 5. AMOVA para as 14 populações caprinas estudadas

Tabela 6. Distâncias pareadas (F_{ST}) entre as 14 populações caprinas estabelecidas

Tabela 7. Análise de *Bottleneck* (“gargalo genético”) para as populações caprinas locais usando o modelo TPM

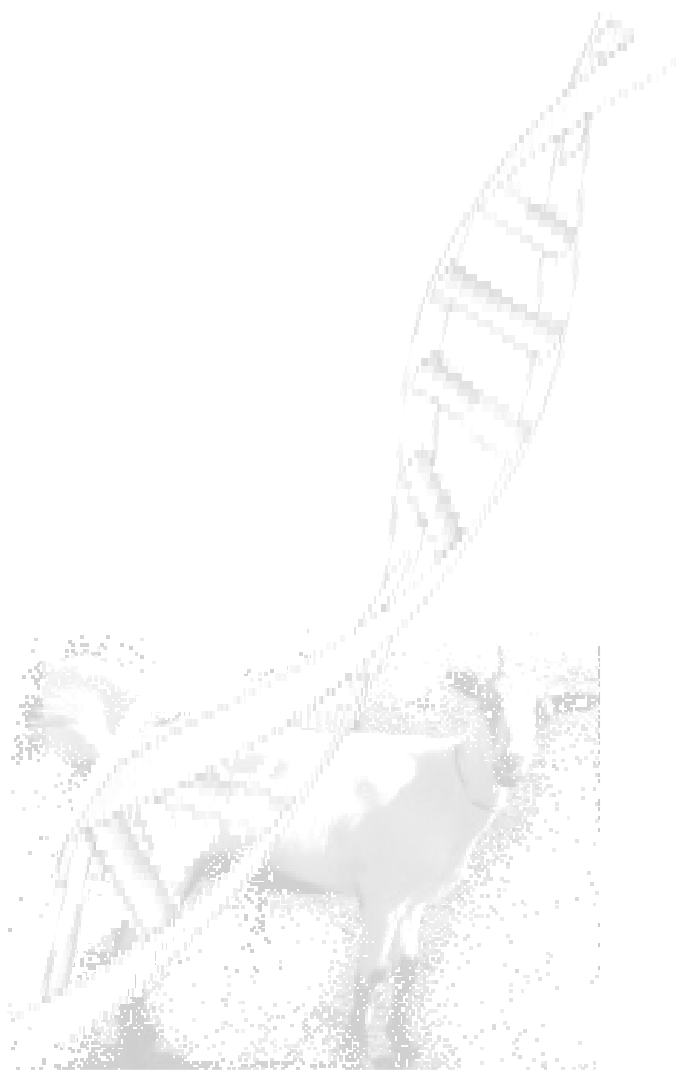
Tabela 8. Designação das populações aos respectivos grupos para $k=13$, usando o programa STRUCTURE

Capítulo III. Uso de inferência clássica e bayesiana para análise das relações genéticas e estudo da estrutura genética de populações caprinas através de marcadores microssatélites

Tabela 1. Matriz de distâncias genéticas entre populações obtidas segundo o método de Nei et al. (1983) D_A (diagonal acima) e método de Reynolds et al. (1983) $D_{Reynolds}$ (diagonal abaixo) utilizando 23 microssatélites

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas entre populações obtidas segundo o método de Nei et al. (1983) D_A (diagonal acima) e método de Reynolds et al. (1983) $D_{Reynolds}$ (diagonal abaixo) utilizando 13 microssatélites

- Tabela 3.** Classificação de indivíduos nas populações de origem pelo método direto, de acordo com Paetkau *et al.* (1995), com base em 23 marcadores microssatélites. Número de indivíduos (N) e percentagem de indivíduos corretamente classificados (%)
- Tabela 4.** Classificação de indivíduos nas populações de origem pelo método direto, de acordo com Paetkau *et al.* (1995), com base em 13 marcadores microssatélites. Número de indivíduos (N) e percentagem de indivíduos corretamente classificados (%)
- Tabela 5.** Classificação de indivíduos as populações de origem pelo método bayesiano (Rannala e Moutain, 1997) utilizando 23 microssatélites. Número de indivíduos (N), percentagem de indivíduos corretamente classificados (%), indivíduos excluídos das restantes populações (N_{EXC}) e percentagem de indivíduos excluídos das restantes populações ($\%_{\text{EXC}}$)
- Tabela 6.** Resumo dos resultados da análise pelo método bayesiano, com 23 microssatélites, relativos aos indivíduos incorretamente classificados (Erro), indivíduos incorretamente classificados em mais de uma população (Pop+) ou não classificados (N.C.) e respectivas porcentagens (%)
- Tabela 7.** Classificação de indivíduos as populações de origem pelo método bayesiano (Rannala e Moutain, 1997) utilizando 13 microssatélites. Número de indivíduos (N), percentagem de indivíduos corretamente classificados (%), indivíduos excluídos das restantes populações (N_{EXC}) e percentagem de indivíduos excluídos das restantes populações ($\%_{\text{EXC}}$)
- Tabela 8.** Resumo dos resultados da análise pelo método bayesiano, com 13 microssatélites, relativos aos indivíduos incorretamente classificados (Erro), indivíduos incorretamente classificados em mais de uma população (Pop+) ou não classificados (N.C) e respectivas porcentagens (%)



INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Breve histórico sobre a caprinocultura

A cabra doméstica (*Capra hircus*) teve sua domesticação no Médio Oriente. E hoje, pelo fato de prosperar em ambientes agressivos e de pouca disponibilidade forrageira, muitas vezes é considerada “a vaca pobre do homem” (MacHugh e Brandley, 2001). Entretanto, estes animais possuem um importante papel na história da humanidade, tanto na alimentação, fornecendo leite, carne, peles, assim como animal de estimação. Segundo Pringles (1998), os caprinos são considerados os primeiros animais a serem domesticados pelos humanos no Período Neolítico, há de 10.000 anos.

Os animais domésticos encontrados hoje foram formados por séculos de seleção praticada pelo homem e seleção natural. Estes animais foram selecionados para uma ampla condição ambientais, de acordo com as necessidades humanas. Atualmente a seleção de um pequeno número de raças consideradas altamente produtivas têm causado o declínio de outras raças (Maudet et al., 2002).

Alguns trabalhos tentam demonstrar a história da origem dos caprinos, através de estudos realizados por DNA mitocondrial, avaliando as estruturas filogeográficas, como os trabalhos de Luikart et al. (2001) e Joshi et al. (2004). Estes estudos demonstraram que os caprinos acompanharam os movimentos migratórios e exploratórios do homem, o que pode ser verificado pela fraca estruturação genética, quando comparados a outros animais domésticos, como os bovinos, animais estes que estão associados a sistemas de produção organizados.

Os animais nativos ou locais são considerados adaptados ao ambiente onde se formaram, possuindo combinações genéticas que lhe confere adaptação especial, as quais não são encontradas em outras raças (Mariante et al., 1999; Delgado, 2002; Ribeiro et al., 2004; Sponenberg e Torres-Díaz, 2004). Existem muitas teorias acerca da introdução desses animais em território brasileiro. Uma delas indica que, possivelmente, os caprinos foram introduzidos juntamente com os rebanhos bovinos no ano de 1534, quando a esposa de Martim Afonso de Sousa, Dona Ana Pimental, autorizou a introdução deste último na Capitania de São Vicente (Pires, 1990). Na época, o Brasil “colônia” destacava-se pelo comércio de pau-brasil e cana-de-açúcar, principalmente. A presença destes animais foi primeiramente relatada por Cardim, em 1583 (Machado et al., 2000), e sabe-se que estes animais vieram de Portugal e Ilha Cabo Verde (Dantas Silva, 1995), uma vez que os barcos procedentes da Europa eram também

abastecidos nesta Ilha. Outras rotas foram igualmente importantes para a introdução de animais na América (Capote et al., 2004), principalmente para a formação das raças locais ou nativas do Brasil. Esses animais podem ser considerados elementos importantes e essenciais ao desenvolvimento rural. Além disso, têm importante papel no desenvolvimento de algumas cidades localizadas no semi-árido, através do comércio de pele trazido por Delmiro Gouveia, que estabeleceu várias agências de compras em vários municípios, contribuindo para o incremento de atividade comercial em algumas cidades (Menezes et al., 1969).

Os rebanhos de caprinos locais encontrados ainda hoje no Brasil se concentram na região Nordeste e, estão distribuídos em pequenos e poucos núcleos de criação, privados e públicos (Ribeiro et al., 2004). São animais dotados de características peculiares como a adaptação ao semi-árido, suportam temperaturas elevadas e escassez de alimento, apresentam resistência às doenças e parasitoses, mantêm a fertilidade, prolificidade e condição corporal mesmo nos períodos mais críticos do ano (períodos secos) (Santos et al., 2007). Em geral, esses animais são criados em sistemas extensivos sem controle zootécnico, tornando de difícil acesso as informações de parentesco. Muitos desses grupos estão sob extrema ameaça (Lima et al., 2007), devido principalmente ao uso em cruzamentos com raças exóticas.

1.2. Situação da caprinocultura no Brasil: Ênfase para a região Nordeste

Os caprinos têm importante papel na economia dos pequenos agricultores, não só no Sertão Nordestino do Brasil, mas também em outros países em desenvolvimento, como a Índia (Joshi et al., 2004), que detém 20% da população caprina mundial. A criação de pequenos ruminantes apresenta potencial significativo, sendo uma alternativa viável e que contribui substancialmente para o desenvolvimento de áreas que apresentam deficiências de recursos naturais no mundo inteiro (Iñiguez, 2004; Ahuya et al., 2005).

O Brasil possui efetivo de 9.450.312 de caprinos, dos quais 8.633.722 estão na região Nordeste (IBGE, 2007). Os três maiores estados produtores são Bahia, Pernambuco e Piauí, revelando o potencial que a região possui para o desenvolvimento de políticas associadas à organização do setor de recursos genéticos locais.

Com relação às raças caprinas locais brasileiras, estas se formaram a partir de animais trazidos pelos colonizadores do “Novo Mundo”. Estas populações encontram-se distribuídas em toda a região Nordeste, em áreas isoladas e derivaram de grupos de rebanhos que se tornaram fundadores em curto período, cujas gerações subsequentes passaram por processos

adaptativos. A seleção natural e artificial, bem como as oscilações casuais e a deriva genética foram elementos importantes no processo de formação das chamadas raças locais (Dobzhansky, 1973; Sponenberg e Torres-Díaz, 2004). Os rebanhos de caprinos locais existentes no Brasil se formaram a partir de processos semelhantes (Figura 2), sendo a raça, segundo Domingues (1968), a unidade fundamental quando se pretende desenvolver planos de conservação e melhoramento adequados.

Os recursos genéticos locais são elementos fundamentais para o desenvolvimento socioeconômico de uma região, entretanto devem ser explorados de forma coerente, para se obter resultados satisfatórios. Sendo assim, é preciso entender a dinâmica das populações remanescentes para que as práticas de manejo e conservação sejam eficientes. Em programas de conservação e manejo genético de populações, é importante conhecer a diversidade genética e a forma de distribuição dessa diversidade em nível inter e intrarracial (estrutura genética).

O avanço da biotecnologia tem permitido o sequenciamento completo do genoma de várias espécies e melhor avaliação da variabilidade genética. Neste contexto, o uso de marcadores moleculares, juntamente com programas computacionais cada vez mais sofisticados, vem permitindo elucidar dúvidas sobre o grau de diversidade genética nas populações analisadas, para que medidas adequadas de controle sejam adotadas.



Repartida



Marotá



Graúna



Serrana Azul ou Azul



Canindé



Moxotó

Figura 2. Grupos de caprinos locais atualmente encontrados no Nordeste brasileiro

1.3. Consideração e manejo dos recursos genéticos na caprinocultura

A primeira conferência das Nações Unidas sobre Ambiente e Desenvolvimento, realizada em 1992, no Rio de Janeiro, resultou na criação da *Agenda 21*, onde os capítulos 14 e 15 estão dedicados às questões de preservação dos recursos genéticos, da agricultura sustentável e do desenvolvimento rural, definindo os objetivos, atividades e compromissos específicos (vide <http://www.igc.apc.org/habitat/agenda21>). Neste contexto, foi criada a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), tendo como principal meta, promover a conservação da diversidade biológica, com medidas relativas ao uso sustentável, investigação de componentes da diversidade biológica, além de outras ações como a conservação *in situ* e *ex situ*.

Para a FAO (2008), o aproveitamento dos recursos locais, naturais e /ou adaptados ao ambiente é medida essencial para o desenvolvimento de atividades no setor pecuário como um todo. Para a caprinocultura, essas necessidades são mais urgentes sendo necessária a adoção de medidas de promoção da atividade com participação de todos os setores e inclusão dos criadores nos processos decisórios. Com isso, pretende-se conter o processo de marginalização por que passam os sistemas tradicionais de produção com raças locais, que vêm sendo esmagados pela indústria pecuária intensiva, com a utilização cada vez maior de animais com características “produtivas melhores” e mais “rentáveis” (FAO, 2008).

A utilização de programas que visem medidas de proteção às raças ameaçadas ou em vias de extinção deve ser revistos para que os recursos genéticos considerados valiosos possam ser manejados adequadamente e aproveitados em seu próprio ambiente de produção. Segundo Bodó (1989), a conservação destes animais pode ser *in situ* ou *ex situ*. O mesmo autor relata que os objetivos da conservação consistem em buscar oportunidades de alimentação para atender a demanda de mercado atual e/ou futura; resguardar a segurança alimentar em função de mudanças que poderão ocorrer nos sistemas de produção vigentes; utilizar estes recursos como oportunidade de pesquisas, potencial socioeconômico e valorá-los quanto aos aspectos histórico-cultural e ecológico.

1.4. Estudos de diversidade genética com auxílio de marcadores moleculares

Com os avanços das técnicas moleculares a análise genética progrediu devido ao surgimento de distintos tipos de marcadores que permitem o estudo da variabilidade a partir do DNA. Dentre eles estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism); Minissatélites ou loco VNTR (Variable Number of Tandem Repeats); RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites); microssatélites ou SSR (Single Sequence Repeats) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Estes marcadores podem diferir quanto ao tipo de herança, à abundância dentro do genoma, ao nível de polimorfismo e informação genética detectados, à especificidade dos locos, à reprodutibilidade, aos requerimentos técnicos e ao investimento financeiro (Buso et al., 2003).

Em geral, os microssatélites são de grande utilidade em várias análises para estudos genético-moleculares e especialmente para estudos de diversidade genética de raças ameaçadas com vistas a sua conservação (Baumung et al., 2004). Também podem ser úteis para esclarecimento de paternidades duvidosas, definir a estrutura das populações, detectarem introgressões, avaliar as fontes de novos fundadores para populações pequenas e ameaçadas e podem indicar locais para reintrodução (Frankham et al., 2008). Os mesmos autores demonstram alguns métodos que podem ser aplicados na caracterização de indivíduos e populações (Tabela 1). Tudo isso é possível porque as diferenças nas sequências de DNA entre indivíduos e populações retêm as informações do histórico evolutivo, permitem explorar os eventos demográficos passados.

Tabela 1. Aplicabilidade de alguns métodos disponíveis para a caracterização genética de indivíduos e populações

Tema	Morfologia	Cromossomos	DNA mt	RAPD	Fingerprint de DNA	Microsatélite
Análise forense	-	-	+++	++	+++	+++
Deteção e datação de gargalos	-	-	++*	++	?	+++
Histórico demográfico	-	-	++*	-	?	+
Migração e fluxo gênico	?	-	++*	++	++	+++
Identificação e rastreamento de indivíduos	+	-	++	+	-	+++
Estrutura populacional	?	-	++?	++	++	+++
Filogeografia	-	-	+++	-	-	+++
Introgessão	+	+	++*	++	++	+++
Paternidade	-	-	-	+	+++	+++
Parentesco entre os fundadores	-	-	-	+++	+++	+++

Fonte: Frankham et al., 2008. SBG

++: técnicas podem ser utilizadas para o propósito especificado;

Vários +: indicam que a técnica tem grande utilidade;

?: casos em que a técnica é valiosa apenas ocasionalmente;

-: indica que a técnica não é usual;

*: detecta apenas a contribuição das fêmeas.

1.4.1. Marcadores microsatélites

Dentre os marcadores baseados em polimorfismos do DNA, os locos de microsatélites são atualmente os mais utilizados para estudo de diversidade genética e estruturação das populações de animais domésticos (Baumung et al., 2004).

Estudos de mapas genéticos detalhados de vários organismos eucarióticos mostraram que os marcadores microsatélites estão distribuídos aleatoriamente e uniformemente por todo o genoma (Chin et al., 1996), são altamente polimórficos, têm herança co-dominante e presença de alelos múltiplos e, por estas características, são empregados em estudos genéticos de populações e áreas relacionadas (Ellegren, 2004).

Segundo Caixeta et al. (2006), as diferentes repetições encontradas nos microsatélites são divididas em:

- a) Repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção;
- b) Repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas;
- c) Repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes.

A literatura é farta em trabalhos que utilizam marcadores microssatélites autossômicos para estudos da diversidade genética em diversas espécies (Saitbekoava et al., 1999; Menezes et al., 2006; Martínez et al., 2007a; 2007b; 2007c; Oliveira, 2007; Valiente, 2007; Qi et al., 2009); estudos de filogenia, para a reconstrução da história evolutiva de populações, além de caracterização de populações locais a partir das frequências alélicas detectadas, estimando a distância genética entre populações e entre indivíduos (Bowcock et al., 1994).

A MoDAD tem como objetivo promover a utilização e definir marcadores comuns em estudos de diversidade animal. Assim sendo, uma lista com cerca de 30 marcadores microssatélites foram definidos para as diferentes espécies de animais domésticos (Hoffmann et al., 2004). Na página <http://dad.fao.org/en/refen/library/guidelin/marker.pdf> encontram-se relacionados os nomes, sequências de *primers*, temperatura de anelamento e tamanho de alelos, além das referências. Quanto ao estudo em que o respectivo marcador tem sido utilizado, a lista se desenvolveu através de numerosos protocolos, levando em conta as características técnicas, como o grau de polimorfismo, adequação e amplificação múltiplas de mesma amostra (Hoffman et al., 2004).

Atualmente, dada as suas características, os marcadores microssatélites têm sido os mais utilizados para estudos de genética de populações. Baumung et al. (2004) relata que eles têm sido preferidos em 90% das pesquisas de diversidade das espécies de interesse zootécnico. Além disso, a abordagem estatística associada aos microssatélites desenvolveu-se rapidamente e sua aplicação tem permitido conquistas revolucionárias na área de genética de populações e conservação de raças.

Também são muito úteis nos estudos com foco no indivíduo (Carlsson, 2008), o que pode ser feito a partir de um conjunto de testes, sendo que a taxa de erro de designação de indivíduos à população de origem é usada para avaliar o poder dos testes (Rosenberg et al., 2001; Bjornstad e Roed, 2002). Isso pode ser verificado em muitos trabalhos os quais permitem agrupar (designar) e/ou excluir o indivíduo à sua possível população de origem pelo uso de programas computacionais específicos, que facilitam a manipulação dos dados microssatélites (Paetkau et al., 1995; Cornuet et al., 1999; Rosenberg et al., 2001; Bjornstad &

Roed, 2002; Brito et al., 2003; Falush et al., 2003; Fan et al. (2008), Berthouly et al. (2008), Dalvit et al. (2008) demonstraram esse poder de discriminação.

Os microssatélites dão bons resultados em estudos de filogenias, tendo mostrado adequado número de locos avaliados e boa taxa de mutação (Loftus et al., 1994; Ishida et al., 1994; Farid et al., 2000; Maudet et al., 2002b). Também têm sido úteis nos estudos de populações com efeito de *bottleneck*, bem como estudos de paternidades duvidosas, identificação forense de indivíduos (Morin et al., 1994; Paetkau et al., 1994; Luitkart et al., 1999; Marshall et al., 1999; Ginja, 2002; Maudet et al., 2002a), estudos de diversidade em caprinos locais (Saitbekova et al., 1999; Martínez et al., 2004; Martínez et al., 2005; Qi et al., 2009), assim como em outras espécies.

1.5. Alguns parâmetros estatísticos aplicados ao estudo genético de populações

O principal objetivo de qualquer programa de conservação deve ser manter e controlar a diversidade em populações locais ameaçadas. Toro et al. (2008) ressaltaram que há distinção entre programas de conservação e de seleção, porém em ambos deve-se ter em conta o controle da consanguinidade e a manutenção de caracteres de interesse, uma vez que se deve agregar valores às populações de interesse.

A diversidade genética existente nas populações deve ser quantificada e avaliada quanto à distribuição entre e dentro de populações. Isso permite gerar informações úteis para melhor gestão genética das populações-alvo, a partir de um grupo de parâmetros são usados para estudar a diversidade intra e inter-populacionais. As frequências alélicas, a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) ou diversidade genética, o conteúdo de informação polimórfico (PIC), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), os estatísticos F (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}) e as distâncias genéticas são os mais importantes nesse tipo de estudo. Além disso, o conhecimento do tamanho efetivo populacional, a localização geográfica da raça e/ou espécie e o modo de reprodução também devem ser conhecidos, pois influenciam a distribuição da diversidade genética.

A precisão da estimativa da diversidade genética depende do número de locos avaliados, da heterozigosidade e do número de amostras de cada população (Barker, 1994). Através da contagem direta dos alelos em um loco e assumindo o pressuposto do EHW podem-se determinar as frequências gênicas ou alélicas. A variância de uma frequência alélica é dada pela expressão binomial:

$$\sigma_x^2 = \frac{x(1-x)}{2n}$$

Sendo x a frequência alélica e n o número de indivíduos da amostra, o erro padrão (δ_ε) das frequências alélicas é obtido pela raiz quadrada da variância (Nei, 1987).

O EHW é um aspecto importante nos estudos de genética da conservação, pois é ele quem proporciona a base para detectar desvios nos acasalamentos ao acaso, testar a ocorrência de seleção, estimar as frequências alélicas em locos que mostram dominância e modelar os efeitos de endogamia e seleção. Segundo Futuyma (1992), o equilíbrio é obtido quando se assume que existe uma população fechada (sem migração), de tamanho grande, com ausência de mutação, segregação mendeliana, com mesma proporção de fertilidade entre os genótipos dos pais, com união ao acaso dos gametas, capacidade de fertilização destes e a sobrevivência de todos os genótipos. Qualquer violação nestes pressupostos promove o desvio do equilíbrio, que pode ser medido pela seguinte expressão:

$$p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1$$

A expressão acima é conhecida como o EHW e descreve a situação de uma população mendeliana com cruzamentos aleatórios, em que as frequências de p e q permanecerão constante geração após geração.

Os termos heteroziguidade e diversidade genética são encontrados na literatura como sinônimos para *heteroziguidade observada* (H_o) e *heteroziguidade esperada* (H_e). Um loco é considerado polimórfico quando o alelo mais comum apresenta uma frequência inferior a 95% e, considerado altamente polimórfico se a heteroziguidade for maior que 70% (Ott, 1992).

A heteroziguidade observada é a proporção de indivíduos heterozigotos observado na população estudada. A heteroziguidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no loco marcado e dependerá do número de alelos e suas respectivas frequências. Quando uma população tem suas frequências genotípicas desviando-se das proporções do equilíbrio, a estimativa de diversidade genética torna-se a melhor alternativa.

Nei (1973) relatou que a diversidade genética em uma população subdividida pode ser dividida em diversidade entre e dentro de subpopulações, podendo o método ser aplicado em qualquer população, desconsiderando o número de alelos por loco, as forças evolutivas como migração, mutação, seleção, o sistema de acasalamento e o tipo de organismo em estudo.

1.5.1. Medidas de fragmentação populacional: estatística F

Uma forma de medir o grau de diferenciação que ocorreu entre os fragmentos é pela endogamia resultante desta fragmentação populacional. A diferenciação entre os fragmentos ou subpopulações está diretamente relacionada com o coeficiente de endogamia dentro e entre populações. A teoria da estatística F foi proposta por Wright (1951) para medir os desvios das frequências genóticas em populações subdivididas através de três parâmetros: F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} , aplicáveis em uma população com nível hierárquico.

Onde a endogamia da população total (F_{IT}) pode ser dividida dentro dela devido a:

- Endogamia dos indivíduos em relação às suas subpopulações ou fragmentos, F_{IS} , e;
- Endogamia devido à diferenciação entre sub-populações, em relação à população total, F_{ST} .

O F_{IS} é considerado o coeficiente de endogamia, f , calculado como a média de todos os indivíduos de todos os fragmentos populacionais, o F_{ST} é o efeito da subdivisão populacional sobre a endogamia, caso uma população apresente altas taxas de fluxo gênico entre os fragmentos, o F_{ST} é baixo, já com baixas taxas de fluxo gênico, as populações divergem e tornam-se endogâmicas, o F_{ST} aumenta (Frankham, et al., 2008).

Pela equação $f = 1 - \frac{H_0}{H_e}$, que pode ser usada para o cálculo da estatística F, e está relacionada à heterozigosidade e a endogamia, essa permite que a estatística F seja determinada a partir da heterozigosidade obtida com marcadores genéticos através das seguintes equações, que foram também relatadas por Nei (1977):

$$F_{IS} = 1 - \left(\frac{H_I}{H_S} \right)$$

$$F_{ST} = 1 - \left(\frac{H_S}{H_T} \right)$$

$$F_{IT} = 1 - \left(\frac{H_I}{H_T} \right)$$

Onde, H_I é a heterozigosidade observada obtida pela média de todos os fragmentos populacionais, H_S é a heterozigosidade esperada de Hardy-Weinberg obtida pela média de todos os fragmentos populacionais, e H_T é a heterozigosidade esperada de Hardy-Weinberg

para a população total. Quando os valores de F_{IS} e F_{IT} são negativos ou próximos de zero, indicam que há variabilidade genética na população devido ao maior número de heterozigotos. Já para o F_{ST} , este pode variar de 0, não havendo diferenciação entre as populações e/ou fragmentos, a 1, com a fixação de diferentes alelos nas populações e/ou fragmentos.

A estatística de Wright pode ser aplicada a diferentes níveis de classificação hierárquicos, como populações dentro de uma região geográfica, subpopulações dentro de populações, colônias dentro de subpopulações e indivíduos dentro de colônias, sendo utilizadas em cada caso, as frequências alélicas correspondentes ao nível em questão (Robinson, 1998). O modelo hierárquico desbalanceado é mais comum que o balanceado, nessa situação as amostras nas subdivisões além de serem tomadas ao acaso, possuem número desigual quanto aos diferentes números de indivíduos e diferentes tamanhos das famílias por populações (Dias, 1998).

1.5.2. Métodos das distâncias

A análise de agrupamento, ou análise de *cluster* é uma técnica multivariada que visa classificar n elementos diversos (populações, indivíduos, etc.), avaliados por um conjunto de p caracteres ou variáveis, a partir de uma medida de distância entre os elementos (Dias, 1998). As sequências homólogas de origem comum podem possuir diferenças entre elas causadas por mutações. Isto ocorre devido à diversificação em linhagens a partir do ancestral comum. Segundo Russo et al. (2001), a quantificação dessas diferenças pode ser utilizada para a inferência de filogenias e estas podem ser expressas em valores ou distâncias, nas quais os algoritmos de reconstruções filogenéticas que utilizam essas medidas são conhecidos como métodos de distâncias.

A distância genética é a diferença entre populações expressa pela função de diferentes genes, devendo-se salientar dois aspectos importantes para seu conhecimento; primeiro, promove informação da filogenia e segundo, que a quantificação da distância genética é proveitosa no estudo da estrutura genética de populações dentro da espécie ou suposta microevolução (Nei, 1973; Nei, 1987).

As distâncias podem ser semi-métricas ou métricas. A primeira deve obedecer às seguintes propriedades: 1) A distância entre uma população X e ela mesma deve ser zero: $d(X,X) = 0$; 2) A distância entre duas populações X e Y deve ser simétrica: $d(X,Y) = d(Y,X)$,

Já para as distâncias métricas observa-se uma desigualdade triangular ($d(X,Y) \leq [d(X,Z)+d(Y,Z)]$) (Katz, 1986).

Muitas distâncias genéticas são essencialmente medidas de distâncias geométricas, combinando conceitos genéticos e geométricos. Nestes casos, as populações são representadas por pontos em espaço multidimensional e a distância genética entre duas populações é medida pela distância geométrica entre os pontos correspondentes no espaço. Para ser considerada como tal deve apresentar os seguintes atributos (Dias, 1998): 1) ser métrica; 2) utilizar frequências alélicas para seu cálculo; 3) refletir predomínio dos fatores de natureza genética sobre os fatores ambientais que estão sendo avaliados. Sendo a natureza genética dependente do seu tipo, do tipo de dado empregado em seu cálculo (fenótipo, isoenzimático ou de DNA) e de como os dados foram gerados.

Na literatura encontram-se diferentes medidas de distâncias genéticas, tais como as distâncias de Balakrishnan (Balakrishnan e Sanghvi, 1968), distância de Jukes-Cantor (Juke e Cantor, 1969), Nei (D (distância padrão), D' (distância máxima) e D_m (distância mínima)) (Nei, 1972), a distância de Rogers (Rogers, 1972), distância de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980), distância de Reynolds (Reynolds et al., 1983), Cavalli-Sforza modificada (D_A) de Nei et al. (1983), distância de Tamura e Nei (Tamura e Nei, 1993), dentre outras distâncias.

A aparente variedade de distâncias genéticas disponíveis pode ser estruturada em dois ou três grupos principais: as distâncias baseadas em distribuições de frequências alélicas (Euclidianas e distâncias angulares) e as baseadas nos tamanhos dos alelos (Laval et al., 2002).

Eding e Laval (1999) demonstraram a aplicação de algumas distâncias genéticas em populações de acordo com o tempo de divergência em raças e/ou espécies (Tabela 2). Observa-se que na distância de Reynolds (D_{Reynolds}) a única força que promove divergência entre raças dentro de um território é a deriva genética e esta tem pouca influência na distância mínima de Nei (D_m). Nas demais distâncias verificam-se influência da mutação e deriva, principalmente quando se compara as raças no mundo e quando estas estão separadas por um longo período.

Tabela 2. Distâncias genéticas, suas características e recomendações para uso em diferentes raças/espécies

<i>Tempo de divergencia</i>	<i>Curto (Raças na Europa)</i>	<i>Intermediário (Raças no mundo)</i>	<i>Longo (Espécies)</i>
Distâncias genéticas	Deriva genética	Mutação e deriva	Mutação e deriva
D_C	-	+ topologia	+ topologia
D_A	-	+ topologia	+ topologia
D	-	+ ramificação longa	+ ramificação longa
$(\delta\mu)^2$	-	+ ramificação longa	+ ramificação longa
D_m	+/-	-	-
$D_{Reynolds}$	+	-	-

Estas distâncias genéticas podem ser calculadas com base em diferentes algoritmos e indicam o grau de proximidades entre populações, além de permitirem a reconstrução das relações históricas e filogenéticas. As fórmulas das distâncias podem ser:

- ❖ Distância Genética Padrão (D):

$$D = -\ln \left(\frac{\sum_i x_i y_i}{\sqrt{\sum_i x_i^2 \sum_i y_i^2}} \right)$$

- ❖ Distância de Goldstein: $(\delta\mu)^2 = (\mu_x - \mu_y)^2$ onde, $\mu_x = \sum_i i x_i$ e $\mu_y = \sum_i i y_i$ são os tamanhos médios dos alelos de cada população.

- ❖ Distância Média Quadrada (DMQ): $DMQ = \sum_{i,i'} (i-i')^2 x_i y_{i'}$, onde i e i' são o tamanho dos alelos de um loco microssatélite.

- ❖ Distância Shriver (D_{SW}): $D_{SW} = W_{XY} - (W_X + W_Y)/2$, onde:

$$W_X = \sum_{i \neq i'} |i - i'| x_i x_{i'}, \quad W_Y = \sum_{i \neq i'} |i - i'| y_i y_{i'} \quad \text{e} \quad W_{XY} = \sum_{i \neq i'} |i - i'| x_i y_{i'}$$

- ❖ Distância de Cavalli-Sforza (D_C): $D_C = (2/\pi) \sqrt{2 \left(1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i} \right)}$

- ❖ Distância de Nei (D_A): $D_A = 1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i}$

❖ Distância mínima de Nei (D_m): $D_m = \frac{1}{2} \sum_i (x_i - y_i)^2$

❖ Distância de Reynolds ($D_{Reynolds}$): $D_{Reynolds} = \frac{1}{2} \frac{\sum_i (x_i - y_i)^2}{1 - \sum_i x_i y_i}$

Nas expressões acima, x_i e y_i são frequências do alelo i^{th} traçados nas respectivas populações X e Y. Simplificando, as fórmulas das distâncias são dadas para um loco. Estendendo a expressão para vários locos, tem-se uma soma a mais de locos e divide-se pelo número de locos onde a somatória aparece nas expressões.

As mais utilizadas são as distâncias de Nei (1972), que estão baseadas no conceito de identificação do gene entre e dentre populações, sendo a distância D_A mais conhecida.

Pressupõem uma medida de identidade genética (I), expressa pela probabilidade de que dado alelo em um loco, tomado ao acaso em duas diferentes populações, sejam idênticos

por descendência que pode ser assim representado: $J_{pq} = \sum p_i q_i$, onde, J_{pq} é a probabilidade de dois alelos tomados ao acaso nas populações P e Q, e p_i e q_i as frequências do alelo i nas populações P e Q. Assim J_P e J_Q são as probabilidades de que dois alelos tomados ao acaso dentro de cada uma das populações P e Q, sejam idênticos.

Então, $J_P = \sum p_i^2$ e $J_Q = \sum q_i^2$

E a identidade genética (I) é definida por: $I = J_{PQ} / \sqrt{(J_P \times J_Q)}$, sendo a distância genética de Nei, dada pelo cologaritmo neperiano de I, como: $D = -\ln(I)$; por ser uma estatística robusta de distância genética, leva em conta tanto os locos polimórficos quanto os monomórficos, onde os valores de D são calculados a partir da amostra populacional, podendo variar entre amostras e fatores tais como divergência genética entre populações, tamanhos das amostras e número de locos estudados promovem esta variação (Dias, 1998).

Atualmente, o F_{ST} vem sendo usado como distância genética em estudos populacionais com ênfase às raças ameaçadas, uma vez que estas podem apresentar de baixa a média diversidade genética. O F_{ST} também pode ser usado para estimar a taxa de migração já que as distâncias genéticas clássicas não conseguem captar o processo de migração, assumindo equilíbrio entre deriva genética e migração (Eding e Laval, 1999). Os mesmos autores relataram que se subpopulações estão isoladas umas das outras é comum ocorrer

consanguinidade com conseqüente fixação de alelos. Nestes casos, quanto maior a semelhança intra-grupo maior diversidade inter-grupos e maior a variabilidade.

1.5.3. Método Bayesiano

Dentre os vários métodos para estimar parâmetros genéticos populacionais, pode-se utilizar a abordagem bayesiana, uma vez que esta incorpora informações prévias ao procedimento de estimação, as quais são especificadas por meio da distribuição *a priori* (Shoemaker et al., 1998; Weir, 1996). A inferência bayesiana, além de possibilitar a incorporação de informações, tem como vantagem a ausência de pressuposições quanto aos modelos utilizados e pela facilidade de estimação por intervalo, denominado de intervalo de credibilidade (Bolstad, 2004).

As informações *a priori* capturam a opinião pessoal sobre a situação antes da observação dos dados. Através do teorema de Bayes, as informações contidas nos dados amostrais são reduzidas com a informação *a priori* sobre os parâmetros desconhecidos induzidos a distribuição *a posteriori* sobre o parâmetro (Silva, 2006). A distribuição *a posteriori* é então usada para construir um estimador do parâmetro desconhecido (Larson, 1982).

Segundo Reis et al. (2008), para se realizar inferência bayesiana, é necessário, além dos dados amostrais, o estabelecimento de uma informação *a priori* sobre o(s) parâmetro(s) e o cálculo da distribuição *a posteriori* do(s) parâmetro(s), onde a informação *a priori* é dada pela densidade de probabilidade $P(\theta)$, a qual expressa o conhecimento do pesquisador sobre o parâmetro a ser estimado, ou quando o pesquisador tem pouco ou nenhum conhecimento a ser incorporado, pode-se considerar uma *priori* não-informativa.

Assim, quando se opta por uma distribuição *a priori*, seja informativa ou não, e obtendo-se a função de verossimilhança, é possível, pelo teorema de Bayes, obter a distribuição *a posteriori*.

$$P(\theta/Y) = \frac{L(Y/\theta)P(\theta)}{\int L(Y/\theta)P(\theta)} \quad (\text{Teorema de Bayes})$$

ou,

$$P(\theta/Y) \propto L(\theta/Y)P(\theta)$$

Em que, $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$, são dados representados por uma amostra aleatória de uma população com densidade f , são utilizados na análise bayesiana por meio da função de verossimilhança ($L(Y/\theta)$), é através desta função que o conhecimento a priori sobre θ é modificado. Para se realizar os cálculos das distribuições *a posteriori* marginais, é necessário algoritmos como os MCMC (Cadeia de Markov e Simulação de Monte Carlo), uma vez que estes são processos iterativos, necessitando de critérios de interações para atingir a convergência. Esses critérios pressupõem que k sequências sejam geradas pelo algoritmo MCMC, partindo de diferentes valores iniciais, num total de m iterações cada uma. Essas sequências fornecem k possíveis resultados inferenciais, relacionados com o valor de m assumido (Reis et al., 2008).

Os métodos MCMC têm sido usados em estatística bayesiana, pois permite simulação da distribuição de forma indireta e a idéia é construir uma cadeia de Markov fácil de ser simulada, com distribuições de equilíbrio igual à de interesse e, após um número suficientemente grande de interações, a cadeia converge para a distribuição de interesse (Jesus, 2004). Dentre os métodos para a construção da cadeia de Markov estão os de Metropolis-Hastings e o Amostrador de Gibbs. O MCMC possibilita simular uma densidade *a posteriori* $P(\theta/Y)$ cuja geração direta é complicada (Jesus, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A conservação de animais domésticos de interesse zootécnico, em perigo de extinção, tem sido alvo de muitos estudos, em geral, por serem considerados adaptados a áreas específicas bem como devido à importância social, econômica e cultural para as populações que ocupam essas áreas, a exemplo dos caprinos locais brasileiros que se concentram na região Nordeste.

A genética molecular é uma ferramenta que vem auxiliando diversos setores da produção animal, com importante papel nos estudos de raças em perigo, tornando-se essencial aos programas de conservação de raças. O estabelecimento de programas de conservação adequados exige que estudos prévios sejam realizados. Dentre esses, a caracterização é uma das principais etapas, sendo alvo de estudos nas diferentes espécies no mundo inteiro (Farid et al., 2000; Machado et al., 2000; Luikart et al., 2001; Ginja, 2002; Joshi et al., 2004; Martínez et al., 2004; Menezes et al., 2006; Martínez et al., 2007; Dalvit et al., 2008). A maioria desses estudos visa avaliar a diversidade inter e intra-racial bem como definir a estrutura genética das populações e/ou raças. Essas informações são essenciais para o estabelecimento de programas de conservação e melhoramento, pois auxiliam na estruturação destes, bem como na definição das raças que devem ser prioridade nestes programas. Com isso, é possível determinar metas a curto, médio e longo prazo.

Além de estudos de diversidade genética e estrutura de populações, a genética molecular tem sido bastante útil em estudos de paternidade, pois o conhecimento da paternidade real de um indivíduo determina o sucesso ou não dos programas de conservação e melhoramento. Os microssatélites têm sido úteis para essa finalidade sendo utilizados no mundo inteiro (Morin et al., 1994; Usha et al., 1995; Luikart et al., 1999; Curi & Lopes, 2002; Santana, 2005; Lins et al., 2006). No Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos com caprinos nessa direção. Assim sendo, a fim de disponibilizar alternativas que auxiliem os planos de conservação e melhoramento de caprinos nativos e exóticos, o presente trabalho teve como finalidade promover o desenvolvimento de um painel de marcadores microssatélites para teste de paternidade em caprinos; estudar a diversidade e estrutura genética dos caprinos locais e possíveis introduções de raças comerciais exóticas nos grupos locais por meio de marcadores moleculares; estudar a diversidade, relações genéticas e estrutura genética de populações nativas e exóticas com 23 microssatélites e, depois, com os microssatélites mais informativos e correlacionar esses resultados.

3. REFERÊNCIAS

Ahuya, C.O.; Okeyo, A.M.; Mwangi-Njuru; Peacock, C. (2005). Developmental challenges and opportunities in the goat industry: The Kenyan experience. *Small Ruminant Res.* v. 60, pp. 197-206.

Balakrishnan, V. and Sanghvi, L .D. (1968). Distance between populations on the basis of attribute data. *Biometrics.* v. 24, pp. 859–865

Barker, J. S.F. (1994). A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 5th. *Proceedings...* Guelph, 1994. 21, pp. 501-508.

Baumung, R.; Simianer, H.; Hoffmann, I. (2004). Genetic diversity studies in farm animal a survey. *Journal of Animal Breeding Genetics.* v. 121, n. 6, pp. 361-374.

Berthouly, C.; Bed-Hom, B.; Tixier-Boichard, M.; Chen, C. F.; Lee, Y. P.; Legros, H.; Verrier, E.; Rognon, X. (2008). Using molecular markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and Asian chicken breeds. *Animal Genetics.* v. 39, pp. 121-129.

Bjorstad, G.; Roed, K. (2002). Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers, *Animal genetics.* v. 32, pp. 59-65.

Bodó, I. (1989). Methods and experiences with in situ preservation of farm animal. In: Wiener, G. (Ed) *Animal Genetics Resources: a global programme for sustainable development.* Rome. (FAO Animal Production and Health Paper, 80). Proceeding of the expert consultation on FAO programmes for the preservation of Animal Genetic Resources.

Bolstad, W. M. (2004). *Introduction to Bayesian Statistics.* Ed. Wiley-Interscience. 351 p.

Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R. & Cavalli-Sforza, L. L. (1994). High resolution of human evolution with polymorphic microsatellites. *Nature*. v. 368, pp. 455-457.

Brito, N. V.; Arranz, J.J.; Bayón, Y.; Colaço, J.; San Primitivo, F. (2003). O método de inclusão, baseado em genótipos multilocus, na alocação de indivíduos de algumas raças bovinas autóctones do norte de Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. pp. 47-49.

Buso, G. S. C.; Ciampi, A. Y.; Moretzsohn, M. C.; Amaral, Z. P. S. (2003). Protocolo para desenvolvimento de marcadores microsatélites. *Circular Técnica*. n. 20, pp. 1-11.

Caixeta, E. T.; Oliveira, A. C. B. de; Brito, G. G. de; Sakiyama, N. S. (2006). Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A. e Caixeta, E. T. *Marcadores Moleculares*. Viçosa. Ed. UFV. 2006. 374 p.

Capote, J.; Tajera, A.; Amills, m.; Argüello, A.; Fresno, M.; López, J.L. (2004). Influencia histórica de los genótipos canarios en la población caprina americana. *AGRI*. n. 35, pp. 49-60.

Carlsson, J. (2008). Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity*. v. 99, n. 6. pp. 616-623.

Chin, E. C. L.; Senior, M. L.; Shu, H.; Smith, J. C.S. (1996). Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome*. v. 39, pp. 866-873.

Cornuet J. M.; Piry S.; Luikart G.; Estoup A.; Solignac M. (1999). New method employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* v. 153, n. 4, pp. 1989-2000.

Dantas Silva, S. (1995). *Pero Magalhães de Cândidavo: Tratado da terra e História do Brasil*. Recife. Editora Massangana – FUNDAGE, pp. 15-16.

Dalvit, C.; Saccà, E.; Cassandro, M.; Gervaso, M.; Pastore, E.; Piasentier, E. (2008). Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Ruminant Research*. v. 8,. pp. 45-51.

Delgado, J. V. (2002). Gestión genética de las poblaciones III: Conservación, Preservación y Mejora. Planificación y programación de la conservación: Organización del substrato; recogida de la información; selección de reproductores. Planificación de los apareamientos. **In:** III Curso Internacional Sobre la Conservación e Utilización de la Razas de Animales Domésticos Locales en Sistemas de Explotación Tradicionales. 23 de septiembre a 18 de octubre de 2002, Córdoba - Espanha.

Dias, L. A. S. (1998). Análise multimensionais. In: Alfenas, A. A., *Eletroforese de isoenzimas: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa, Ed. UFV, 1998, pp. 381-404.

Dobzhansky, T. (1973). *Genética do processo evolutivo*. Tradução de Celso Abbade Mourão. São Paulo, Polígono. Ed. Da Universidade de São Paulo. 1973. 453 p.

Domingues, O. (1968). *Introdução à Zootecnia*. 3 ed. Série didática 5, Rio de Janeiro. 386 p.
Eding J.H. & Laval, G. (1999). Measuring the genetic uniqueness. In **"Livestock In Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources"** edited by Oldenbroek JK. DLO institute for Animal Science and Health (Lelystad, the Netherlands).

Eding, J.H.; Laval, G. (1999). Measuring the genetic uniqueness. In **"Livestock In Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources"** edited by Oldenbroek JK. DLO institute for Animal Science and Health (Lelystad, the Netherlands).

Ellegren, H. (2004). Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature*. v. 5, june 2004, pp. 435-445.

Fan, B.; Han, J-L.; Chen, S-L; Mburu, D. N.; Hanotte, O.; Chen, Q-K.; Zhao, S-H.; Li, K. (2008). Individual-breed assignments in caprine populations using microsatellite DNA analysis. *Small Ruminant Research*. v. 75. pp. 154-161.

Falush, D.; Stephens, M. and Pritchard, J. K. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, v. 164, p. 1567–1587 (August)

Farid, A.; O' Reilly, E.; Dollard, E.; Kelsey Jr., C.R. (2000). Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science*. v. 80, n. 1, pp. 9-17.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2008). **Fundamentos de Genética da Conservação**. Tradução: Sociedade Brasileira de genética. ED. SBG. 280p.

Futuyma, D. J. (1992). *Biologia Evolutiva*. Tradução de Mário de Vivo e coord. Fábio Melo Sene. 2 ed. Ribeirão Preto, SBG/CNPq. 646p.

Ginja, C. J. (2002). *Identificação de raças Bovinas Portuguesas através da utilização de marcadores moleculares*. Tese de mestrado em Ciências Agrárias: Produção Animal. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. 145 p.

Hoffmann, I.; Marsan, P.A.; Barker, J.S.; Cothran, E. G.; Hanotte, O.; Lenstra, J. A.; Milan, D.; Weigend, S.; Simianer, H. (2004). New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. *Proc. 29th Int. Conf. on Animal Genetics*, Tokyo, Japan, September 11-16, 2004: 123 (abstr).

Iñiguez, L. (2004). Goats in resource-poor systems in the dry environments of West Asia, Central Asia and the Inter-Andean valleys. *Small Ruminant Res*. v. 51, pp. 137-144.

Ishida, N.; Hasegawa, T.; Takeda, K.; Sakagami, M.; Onishi, A.; Inumaru, S.; Komatsu, M.; Mukoyama, H. (1994). Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetic*. v. 25, pp. 215-221.

Jesus, C. D. (2004). *Uma análise bayesiana para dados educacionais*. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Estatística. Instituto de matemática da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. 154fls.

Joshi, M. B.; Rout, P. K.; Mandal, A. K. ; Tyler-Smith, C. ; Singh, L. ; Thangaraj, K. (2004). Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Mol. Biol. Evol.* v. 21, n.23, pp. 454-462.

Jukes, T. H.; Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro, H. N. (ed) . *Mammalian protein metabolism*. v. 3. (New York: Academic Press), pp. 21–32.

Katz, M, (1986), Etude des propriétés de certains indices de distance génétique et de leurs estimateurs. Doctoral thesis. Université Paris, Paris.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* v. 16, pp. 111–120.

Larson, H. J. (1982). *Introduction to probability theory and statistical and inference*. John Wiley & Sons. Singarope. 3 ed. 1982, 637 p.

Laval, G.; Sancristobal, M.; Chevalet, C. (2002). Measuring genetic distances between breeds: use of some distances in various short term evolution models. *Genet. Sel. Evol.*, v. 34, pp.481-507

Lima, P.J.S.; Souza, D.L.; Pereira, G. F.; Torreão, J.N.C.; Moura, J.F.P.; Gomes, J.T.; Lopez Acosta, J.M.; Rey Sanz, S.; Ribeiro, M.N.; Pimenta Filho, E.C. (2007). Gestão genética de raças caprinas nativas no estado da Paraíba. *Arch. Zootec.* 56 (Sup. 1), pp. 623-626.

Loftus, R. T.; MaChungh, D.E.; Bradlzy, D.G.; Sharp, P.M.; Cunningham. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. v. 91. pp. 2757-2761.

Luikart, G.; Biju-Duval, M-P.; Ertugrul, O. ; Zagdsuren, Y. ; Maudet, C. and Taberlet, P. (1999). Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics*. v. 30, pp. 431-438.

Luikart, G.; Gielly, L.; Excoffier, L.; Vigne, J-D.; Bouvet, J.; Taberlet, P. (2001). Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *PNAS*. v. 98, n. 10, pp. 5927-5932.

Machado, T.M.M.; Chakir, M.; Lauvergne, J.J. (2000). Genetic distance and Taxonomic tree between goats of Ceará State (Brazil) and goats of mediterranean region (Europe and Africa). *Genetics and Molecular Biol.* v. 23, n 1, pp. 121-125.

MacHugh, D. E. e Bradley, D. G. (2001). Livestock genetic origins: Goats buck the trend. *PNAS*, v. 98. n. 10, pp. 5382-5384.

Mariante, A. S.; Egito, A. A.; Albuquerque, M. S. M. (1999). Situação atual da conservação de recursos genéticos animais no Brasil. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2, Brasília. *Anais*. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 8 p.

Marshall, T.C.; Sunnucks, P.; Spalton, J. A.; Greth, A.; Pemberton, J.M. (1999). Use of genetic data for conservation management: the case of the Arabian oryx. *Animal Conservation.*, v. 2, pp. 269-278.

Martínez, A.M.; Carrera, M. P.; Acosta, J.M.; Rodriguez-Gallardo, P.P.; Cabello, A.; Camacho, M.E.; Delgado, J.V. (2004). Genetic characterisation of the Blanca Andaluza Goats base don microsatellite markers. *South African Jour. Of Anim. Sci.* v. 34, n. 1, pp. 17-19.

Martínez, A.M., J.L. Vega-Pla, J.M. Lozano, M.P. Carrera, J.M. Acosta; A., Cabello. 2005. Caracterización genética de la cabra Murciano-Granadina con microssatélites. *Arch. Zootec.* 54, suplemento, pp. 327-331.

Martínez, A.M.; Quiroz, J.; Delgado, J. V.; Vega-Pla, J. L. 2007a. Caracterización genética de la oveja Canaria con microssatélites de ADN. *Archivos de Zootecnia*, v. 55, n. 216, pp. 421-424.

- Martínez, A.M.; Rocha, L.; Quiroz, J.; Delgado, J. V. 2007b. Estudio de la diversidad genética intrarracial de la cabra murciano-granadina con microsatélites de ADN. *Archivos de Zootecnia*, v. 56, n. 1, pp. 417-420.
- Martínez, A.M.; Quiroz, J.; Marquez, J. R.; Delgado, J. V. 2007c. Estudio de la diversidad genética del cerdo negro canário con microsatélites de ADN. *Archivos de Zootecnia*, v. 56, n. 1, pp. 425-428.
- Maudet, C.; Luikart, G.; Taberlet, P. (2002a). Genetic diversity and assignment test among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J. Anim. Sci.* v. 80. pp. 942-950.
- Maudet, C. ; Miller, C.; Bassano, B.; Breitenmoser-Würsten, C.; Gauthier, D.; Obexer-Ruff, G.; Michallet, J.; Taberlet, P.; Luikart, G. (2002b). Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex (*Capra ibex (ibex)*). *Mol. Ecol.* v. 11. pp. 421-436.
- Menezes, M. P. C.; Martínez, A. M.; Ribeiro, M.N.; Pimenta Filho, E.C.; Bermejo, J. V. D. (2006). Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando 27 marcadores microsatélites. *R. Bras. Zootec.* v.35, n.4, pp. 1336-1341.
- Morin, P. A.; Wallis, J.; Moore, J. J.; Woodruff, D. S. (1994). Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. *Molecular Ecology*. v. 3, pp. 469-477.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*. v. 106, pp. 283-282.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 70, pp. 3321-3323.
- Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* v.41, pp. 225-233.

Nei, M.; Tajima, F.; Tatenno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. **Journal of Molecular Evolution**. v. 19, pp. 153-170.

Nei, M. (1987). Genetic distance molecular phylogeny. In: **Population Genetics and Fishery Management** (N. Ryman and F. Utter, eds.), University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 193-223.

Oliveira, J.C.V. (2007). **Variabilidade Genética em Caprinos**. 104 f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia, Recife, Pernambuco.

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

Paetkau, D.; Strobeck, C. (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. **Molecular Ecology**. v. 3, pp.489-495.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**. v.4, pp. 347-354.

Pires, M.I.C. (1990). **Guerra dos Bárbaros: Resistência Indígena e Conflitos no Nordeste Colonial**. Recife: FADURPE, 1990. 146 p.

Piry, S.; Alapetite, A.; Cornuet, J-M.; Paetkau, D.; Baudouin, L.; Estoup, A. (2004). GeneClass2: A software for genetic assignement and first-generation migrant detection. **Journal of Heredity**. v.95, n. 6, pp. 536-539.

Pringles, H. (1998). Neolithic agriculture: reading the signs of ancient animal domestication. **Science**. v. 282, pp. 1448.

Qi, Y.; Luo, J.; Han, X. F.; Zhu, YZ, Chen, C.; Liu, JX; Sheng, H. (2009). Genetic diversity and relationships of 10 chinese goat breeds in the Middle and Western China. **Small Ruminant Research**. v. 82. pp. 88-93.

Reis, R. L. dos; Muniz, J.A.; Silva, F. F; Sáfadi, T.; Aquino, L.H. de. (2008). Inferência Bayesiana na análise genética de populações diplóides: estimação do coeficiente de endogamia e da taxa de fecundação cruzada. *Ciência Rural*. Santa Maria, v. 38, n. 5, pp. 1258-1265.

Reynolds, J.; Weir, B. S.; Cockerham, C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics Society of America*. v. 105, pp. 767-779.

Ribeiro, M. N. ; Gomes Filho, M. A.; Bermejo, J. V. D.; Valejo, M. E. C. ; Oliveira, J. C. V.; Cruz, G. R. B.; Rocha, L. L. da; Silva, R. C. B. da; Menezes, M. P. C.; Pimenta Filho, E. C.; Brito, M. P. de . **CONSERVAÇÃO DE RAÇAS DE CAPRINOS NATIVOS DO BRASIL: HISTÓRICO, SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS**. 1. ed. Recife: Maria Norma Ribeiro, 2004. v. 1. 62 p.

Robinson, I.P. (1998). Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: Alfenas, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa, Ed. UFV, pp. 329-380.

Rogers, J. S. (1972). **Measures of genetic similarity and genetic distance**. Studies in genetics VII. University of Texas Publications.

Rosenberg, N. A.; Burke, T.; Elo, K.; Feldman, M. W.; Freidlin, P. J.; Groenen, M. A. M.; A.Vignal Hillel, J; Maki-Tanila, A.; Tixier-Boichard, M.; Wimmers, K.; Weigend, S. (2001). Empirical Evaluation of Genetic Clustering Methods Using Multilocus Genotypes From 20 Chicken Breeds. *Genetics*. 159, pp. 699–713 (October).

Russo, C. A. M.; Miyaki, C. Y.; Pereira, S.L. (2001). Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. In: Matioli, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto. Ed. Holos, 2001, 202 p.

Saitbekova, N.; Gaillard, C.; Obexer-Ruff, G.; Dolf, G. (1999). Genetic diversity Swiss goat breeds bases on microsatellite analysis. *Animal Genetics*. v. 30. pp. 36-41.

Santos, D. O.; Rêgo, J. P. A. do; Villela, L. C. V.; Silva, F. L.R.; Faco, O. (2007). BGCON – Banco de germoplasma de caprinos e ovinos naturalizados: uma alternativa para inventariar a infra-estrutura dos recursos genéticos existentes. *Comunicado Técnico*, n. 85. EMBRAPA, Sobral, CE.

Shoemaker, J.; Painter, I.; Weir, B. S. (1998). A Bayesian characterization of Hardy-Weinberg Disequilibrium. *Genetics*. v. 149: (August 1998), pp. 2079–2088.

Silva, J, P. da. (2006). *Uma abordagem bayesiana para o mapeamento de QTLs utilizando o método MCMC com saltos reversíveis*. 2006. 81 fls. Dissertação. Estatística e Experimentação Agronômica. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba – São Paulo.

Sponenberg, D.P.; Torres-Díaz, R. O. (2004). Taller terminologia de la conservación ¿Qué es una raza, por qué es importante?. *V Simposio Iberoamericano sobre la Conservación y utilización de Recursos Zoogenéticos*.

Tamura, K.; Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* v. 10, pp. 512-526.

Toro, M. A; Caballero, A.; Fernández, J. (2008). Mejora genética y gestión de poblaciones pequeñas. *ITEA*, v. 104, n. 2, pp. 268-282.

Valiente, J. Q. (2007). *Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas*. Tese. 2007. Universidade de Córdoba – Departamento de Genética. Espanha. 155fls.

Weir, B. S.; Cockerham, C. (1984). Estimating F-statistics for analysis of population structure. *Evolution*. v. 36, pp. 1358-1370.

Wright, S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, v.15, p.323-354, 1951.

3.1. Referencias da web

FAO. (2008). FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. (2008). DOMESTIC ANIMAL DIVERSITY INFORMATION SYSTEM <<http://dad.fao.org>> .
<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/es/A5.html>

IBGE (2007) – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Censo Agropecuário. Resultados preliminares. Disponível em a:
<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=t&o=22>. Acesso em: 27/06/2009.

Menezes, H. *Contribuição da caprinocultura no povoamento do sertão*. In: MENEZES H CAMARA, V. MOTA, PARAHYM, COSTA FILHO, G. A. O bode no Brasil. Instituto Joaquim Nabuco de Pesquisa Sociais – IJNP/MEC. Recife vol. Único. (1969). pp. 38-49. Ministério da Agricultura. Pecuária. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/>. Acesso em 15/04/2007.



CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

Desenvolvimento de um painel de microssatélites para teste de paternidade em caprinos

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um painel de microssatélites para teste de paternidade em caprinos como auxílio a programas de conservação e melhoramento das raças locais. Foram genotipados 381 animais de 10 populações caprinas sendo seis raças ou ecotipos locais brasileiros (Azul, Canindé, Graúna, Marota, Moxotó e Repartida) e quatro raças exóticas utilizadas atualmente no Brasil (Alpina, Anglo-Nubiana, Boer e Saanen). Realizou-se nove sistemas multiplex, totalizando 27 microssatélites. Foram estimados o PIC, as probabilidades de exclusão dos marcadores e o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações e, em seguida, determinada a probabilidade de identidade. Para o sistema de 27 microssatélites a probabilidade de exclusão combinada foi de 0,999991 e 0,999999 (PE_1 e PE_2) e, 21 microssatélites apresentaram $PIC > 0,60$, onde quatro apresentaram-se monomórficos em algumas populações. Verificaram-se desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg significativos ($P < 0,05$) para os marcadores, sendo o CSSM66, o que apresentou maior número de populações (8) com desvio. Para compor o painel foram escolhidos 9 marcadores dos quais oito foram comuns aos dois grupos estudados (caprinos locais e exóticos), sendo o BM1818 mais informativo nas populações locais e, o marcador BM6506 nas populações exóticas. A probabilidade de exclusão combinada com o grupo dos oito microssatélites foi de 0,9943 e 0,9997 (PE_1 e PE_2). Baseado no cálculo das probabilidades de identidade dentro das populações foi possível discriminar um indivíduo entre um milhão (10^6). Os resultados indicaram a possibilidade de empregar poucos microssatélites na investigação de paternidade em caprinos, com grau de confiabilidade considerado bom, minimizando custos.

Palavra-chave: Conservação de recursos genéticos, caprinos, microssatélites, probabilidade de exclusão.

Development of a panel of microsatellites for testing paternity in goats

Summary

The aim of the present study was develop a panel of microsatellites for testing paternity in goats as an aid for conservation and improvement programs for local breeds. A total of 381 animals from 10 goat populations [six local Brazilian ecotypes/breeds (Azul, Canindé, Graúna, Marota, Moxotó and Repartida) and four exotic breeds currently used in Brazil (Alpine, Anglo-Nubian, Boer and Saanen) were genotyped. Nine multiplex systems were performed, totaling 27 microsatellites. Polymorphism information content (PIC), probability of exclusion (PE) of the markers and Hardy-Weinberg (HW) equilibrium were estimated for the populations and the probability of identity was determined. For the system with 27 microsatellites, the combined PE was 0.999991 and 0.999999 (PE₁ and PE₂) and the 21 microsatellites exhibited PIC > 0.60; four microsatellites were monomorphic in some populations. Significant deviations from HW equilibrium (P < 0.05) were found for the markers; CSSM66 was deviated from HW equilibrium in the greatest number of populations (8). Nine markers were selected to make up the panel, eight of which were common to both groups (local and exotic goats); the BM1818 marker was the most informative in the local populations and the BM6506 marker was the most informative in the exotic populations. Combined PE with the group of eight microsatellites was 0.9943 and 0.9997 (PE₁ and PE₂). Based on the calculation of the probabilities of exclusion within the populations, it was possible to discriminate one individual from among a million (10⁶). The results indicate the possibility of employing few microsatellites in the investigation of paternity in goats with a satisfactory degree of reliability and minimal cost.

Keywords: Conservation of genetic resources, goats, microsatellites, probability of exclusion

1. INTRODUÇÃO

A conservação de recursos genéticos animais vem se destacando cada vez mais com a conscientização da importância da sua preservação para futuros estudos e utilização pela sociedade.

Um plano de gestão genética adequado deve ter como alvo evitar o acasalamento entre indivíduos aparentados para minimizar a consanguinidade e, com isso, assegurar a conservação de uma raça.

Segundo Delgado (2002) a decisão de conservar uma determinada raça depende de que se reúnam as condições apropriadas para a manutenção e que ocupe lugar de destaque na lista de prioridades: aspectos genéticos e produtivos, vulnerabilidade, aspectos ecológicos, importância social e possibilidade de evolução e manutenção como raça. Quando explorados de forma coerente, os recursos locais podem contribuir sobremaneira para o desenvolvimento socioeconômico das populações das quais dependem, uma vez que as populações de animais locais são consideradas adaptadas aos nichos ecológicos em que vivem.

A perda da diversidade genética diminui a capacidade de manter e melhorar a produção e produtividade pecuária. Portanto, a conservação da biodiversidade em geral é elemento indispensável para a sustentabilidade dos sistemas de produção locais, pois quanto maior a diversidade de uma raça maior sua capacidade de reagir frente às mudanças ambientais e de mercado (FAO, 2008).

Assim, o estudo da diversidade genética deve ser juntamente com o inventário, uma das primeiras medidas para se definir a situação de risco de uma raça e propor planos adequados de conservação.

Com o desenvolvimento da genética molecular, os equipamentos e *softwares* para a manipulação dos dados têm sido utilizados como ferramentas poderosas para o estudo genético e controle de espécies ameaçadas, permitindo assim a identificação de possíveis introduções de genótipos, detectando de forma eficiente relações de parentesco.

Curi e Lopes (2001) relataram que a divulgação de marcadores moleculares tornou fácil a quantificação da variabilidade genética existente entre indivíduos e populações, assim como a realização de teste de paternidade em vegetais, animais e humanos, existindo, hoje, grande número de marcadores que podem vir a serem utilizados em laboratório e até mesmo propostos ao MAPA para inclusão na relação de marcadores para testes de paternidade em animais domésticos.

A utilização de teste de paternidade é, pois, ferramenta indispensável para regularizar a implementação de sistemas de registros no controle de identificação de animais. Segundo Araújo et al. (2004) todas as metodologias existentes para avaliação genética são baseadas em informações de parentesco e, portanto, subordinadas a registros confiáveis de paternidade. Carneiro et al. (1999) comentaram que os testes de paternidade são importantes para o melhoramento genético, principalmente para identificação de genealogias errôneas, que podem prejudicar os ganhos genéticos.

A análise de DNA é uma poderosa ferramenta para a verificação do grau de parentesco e identificação individual dos animais, sendo a forense humana líder nessa área, tendo desenvolvido painéis de marcadores microssatélites altamente informativos entre populações humanas (DeNise et al., 2004).

Os microssatélites ou SRTs (Short Tandem Repeats) consistem em sequências curtas de nucleotídeos (1-6pb) que estão distribuídos em todo o genoma e se repetem diversas vezes. Por apresentarem-se altamente polimórficos, herança co-dominante e baixo custo, passaram a ser ferramentas úteis nos estudos em genética de conservação, sendo utilizados em cruzamentos endogâmicos com objetivo de manter ou maximizar a diversidade genética, bem como para descobrir as relações entre indivíduos, grupos, populações, raças ou espécies para planos de acasalamentos ou identificação de unidades de conservação (Lins et al., 2006, Marshall et al., 1999). Também são utilizados em mapeamento físico e genético de genomas, estudos de genética evolutiva e de populações, bem como em investigações criminais.

Segundo Tommasini et al. (2003) as melhorias na tecnologia em marcadores moleculares, como a amplificação de DNA em PCR multiplex, que constitui da amplificação simultânea de mais de 1 SSR em uma única reação, combinado com o uso de fluorescências baseado na detecção automática do tamanho e clonagem do DNA, permitindo uma rápida e precisa aquisição dos dados.

Na Europa tornou-se rotineira a verificação de parentesco em cabras e Santana (2005) relatou a importância do desenvolvimento de painéis de microssatélites para utilização em rastreabilidade de caprinos locais espanhóis, como um sistema de identificação individual para qualidade de produtos de origem animal.

Devido à crescente preocupação e procura por produtos naturais, saudáveis, bem como a origem destes, o desenvolvimento de painéis serve de base para identificar os indivíduos a sua genealogia, possibilita a rastreabilidade e pode ser útil também no futuro para assegurar os produtos derivados de determinadas raças.

Os programas de melhoramento genético para caprinos de raças e grupos locais bem como para as exóticas, no Brasil, ainda são incipientes e as iniciativas de criação de banco de dados se devem exclusivamente a esforços isolados de instituições de pesquisa e dos próprios criadores.

Com base nesse panorama e pelo fato da paternidade ser de difícil detecção por análises morfológicas em caprinos, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um painel de microssatélites para futuros teste de paternidade nestes animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Material biológico*

Foram utilizados 381 animais referentes a 10 populações caprinas, das quais seis consistiam de ecótipos locais brasileiros (Azul, Canindé, Graúna, Marota, Moxotó e Repartida) e quatro raças exóticas utilizadas atualmente no Brasil (Alpina, Anglo-Nubiana, Boer e Saanen). Na tabela 1 encontra-se o número de animais utilizados em cada população, a origem do material coletado e siglas das populações.

Tabela 1. Número de amostras (N), origem do material biológico (bulbo capilar) das populações estudadas por raça/grupos e sigla

Raça	N	Origem	Sigla
Alpina	40	Pernambuco/Nordeste-Brasil	ALP
Boer	40	Pernambuco/Nordeste-Brasil	BOER
Anglo-Nubiana	26	Pernambuco/Nordeste-Brasil	ANG
Saanen	36	Pernambuco/Nordeste-Brasil/Espanha	SAAN
Azul	40	Paraíba/Nordeste-Brasil	S.AZUL
Moxotó	40	Pernambuco/Nordeste-Brasil	MOX
Marota	40	Piauí/Nordeste-Brasil	MAR
Canindé	40	Paraíba/Nordeste-Brasil	CAN
Repartida	40	Bahia/Nordeste-Brasil	REPAR
Graúna	39	Rio Grande do Norte/Nordeste-Brasil	GRAU

2.2. Extração do DNA e reação de amplificação dos microssatélites

Foram extraídas de 511 caprinos amostras de bulbos capilares de cada animal, colocados em envelopes e acondicionados em freezer até o momento da extração do DNA.

Para a extração do DNA foram recolhidos 40 bulbos de cada animal, estes eram colocados em placas de PCR, adicionando-se uma solução de extração de 100µl (Tabela 2) em cada poço. Em seguida, as amostras foram incubadas a 56°C, durante 50 minutos e depois a 95 °C por mais 10 minutos, deixando a temperatura baixar até 8°C. As amostras foram armazenadas a -20 °C até a hora das análises.

Tabela 2. Solução de extração de DNA

Reagentes	Quantidade
Água ultra pura	1ml
Chelex® 100- Resin (Bio-Rad)	0,05g
Proteinase-K	1mg

2.3. Microssatélites analisados

Foram estudados 27 microssatélites. Na tabela 3 encontram-se as multiplex com os marcadores utilizados pelo Laboratório de Genética da Universidade de Córdoba, Espanha, para estudos de diversidade genética em populações caprinas, com as respectivas sequências, classes do tamanho dos alelos, temperatura de anelamento, fluorescência, e reações de multiplex que eram usadas em cada um dos quatro géis e referências.

Tabela 3. Multiplex com os respectivos microssatélites, sequências direta e reversa, tamanho em pares de base (pb), temperatura de anelamento, fluorocromos e referências

<i>Multiplex</i>	<i>locos</i>	Direta	Reversa	Tamanho (pb)	Temp. anelamento (°C)	Gel	Fluorocromo	Cromossomo	Referências*
M1	BM6506	<i>GCACGTGGTAAAGAGATGGC</i>	<i>AGCAACTTGAGCATGGCAC</i>	190-228	55	I	Hex	1	1
	INRA63	<i>AGGAATATCTGTATCAACCTCAGTC</i>	<i>CTGAGCTGGGGTGGGAGCTATAAATA</i>	153-185			Hex	14	12
	CSRD247	<i>GGACTTGCCAGAACTCTGCAAT</i>	<i>CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG</i>	208-250			Fam	14	10
	TGLA122	<i>CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC</i>	<i>AATCACATGGCAAATAAGTACATAC</i>	130-180			Fam	21	11
M2	INRA5	<i>CTTCAGGCATACCCCTACACCACATG</i>	<i>AAATATTAGCCAACCTGAAAACCTGGG</i>	125-155	55	I	Hex	10	12
	HAUT27	<i>TTTTATGTTCATTTTTACTGG</i>	<i>AACTGCTGAAATCTCCATCTTA</i>	125-160			Ned	27	9
	BM8125	<i>CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG</i>	<i>GGGGGTTAGACTTCAACATACG</i>	100-128			Fam	17	1
M3	ILSTS011	<i>GCTTGCTACATGGAAAGTGC</i>	<i>CTAAAATGCAGAGCCCTACC</i>	253-295	55	I	Hex	14*(ovino)	3
	BM1818	<i>AGCTGGGAATATAACCAAAGG</i>	<i>AGTGCTTCAAGGTCCATGC</i>	250-290			Fam	23	2
	SPS115	<i>AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG</i>	<i>AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG</i>	235-265			Ned	15	6
M4	CSSM66	<i>ACACAAATCCTTCTGCCAGCTGA</i>	<i>AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG</i>	175-265	55	II	Hex	9*(ovino)	5
	BM6526	<i>CATGCCAAACAATATCCAGC</i>	<i>TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC</i>	145-195			Fam	26	1
M5	INRA6	<i>ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC</i>	<i>AAACCACAGAAATGCTTGGGAAG</i>	153-185	55	II	Hex	7	1
	MM12	<i>CAAGACAGGTGTTCAATCT</i>	<i>ATCGACTCTGGGGATGATGT</i>	85-135			Ned	9	8
M6	HSC	<i>CTGCCAATGCAGAGACACAAGA</i>	<i>GTCGTCTCCTGTCTTGTTCATC</i>	270-306	55	II	Hex	20	7
	SRCRSP8	<i>TGCGGTCTGGTCTGATTTCAC</i>	<i>CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAG</i>	210-260			Ned	desconhecido	3
	McM527	<i>GTCCATTGCCTCAAATCAATTC</i>	<i>AAACCATTGACTACTCCCAA</i>	150-190			Ned	5	7
M7	OarFCB304	<i>CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG</i>	<i>CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG</i>	130-180	55	III	Hex	19*(ovino)	4
	OarFCB11	<i>GGCCTGAACTCACAAAGTTGATATATCTATCAC</i>	<i>GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC</i>	120-160			Fam	2	4
	MAF65	<i>AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG</i>	<i>CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG</i>	110-152			Ned	15	3
	MAF209	<i>GATCACAAAAAGTTGGATACAACGTGG</i>	<i>TCATGCACITTAAGTATGTAGGATGCTG</i>	100-125			Hex	17	3
	BM1329	<i>TTGTTTAGGCAAGTCCAAGTC</i>	<i>AACACCGCAGCTTCATCC</i>	153-185			Ned	6	1
	INRA023	<i>GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC</i>	<i>TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC</i>	185-230			Hex	3	2
M8	ETH10	<i>GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA</i>	<i>CCTCCAGCCCACITTTCTTCTC</i>	200-230	55	IV	Fam	5	13
	ETH225	<i>GATCACCTTGCCACTATTTCT</i>	<i>ACATGACAGCCAGCTGCTACT</i>	130-165			Ned	17*(ovino)	5
	OarFCB48	<i>GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCCAC</i>	<i>GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG</i>	140-170			Fam	17	4
M9	CSRM60	<i>AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCCA</i>	<i>AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG</i>	79-85	60	IV	Fam	10	6

* 1, Bishop et al. (1994); 2, Li et al. (2002); 3, Luikart et al. (1999); 4, Yang et al. (1999); 5, Barendse et al. (1994); 6, Moore e Byrne (1994); 7, Isag (2002); 8, Mommens et al. (1994); 9, Thieven et al. (1997); 10, FAO (2004); 11, George et al. (1992); 12, Vaiman et al. (1994); 13, Solinas-Toldo et al. (1993).

2.4. Amplificação do DNA pela técnica da PCR

As reações da PCR foram preparadas de acordo com os reagentes encontrados na tabela 4. Os produtos foram preparados em placas de 96 poços, com as amplificações realizadas num termociclador de acordo com os seguintes ciclos:

- 5' a 95 °C
- 35 ciclos: Desnaturação 30'' a 95 °C; 45'' a temperatura de hibridização; e, 30'' a 72 °C de extensão;
- Ciclo final: 72 °C durante 30 segundos.

Tabela 4. Componentes para a reação da PCR

Reagentes	Quantidade
DNA	5µl
PCR buffer 10X	1,2 µl
MgCl ₂	1µl (2,5 mM)
dNTP 10µM	200µM de cada (0,25µl)
Taq	0,5U
Primer 10µM	0,25 pmol de cada
H ₂ O ultrapura	Completar até o volume final
Volume final	25 µl

2.5. Preparação dos géis e sequenciamento dos fragmentos amplificados

Para o preparo do gel utilizou-se um kit comercial ReproGel®377 da GE Healthcare – Solução A (12% acrilamida/bisacrilamida) e solução B, com agente desnaturante (ureia) um indicador para luz ultravioleta e TBE. Em seguida, preparou-se uma mistura composta por 10 ml da solução A e 10 ml da B, com volume final 20 ml, a qual era aplicada em placas de vidros para polimerização, devidamente limpa para que não houvesse interferência na hora da leitura das fluorescências, com um pente de 50 poços, para posterior polimerização do gel. Em seguida preparou-se o tampão de corrida tris-borato-EDTA (TBE) (Tabela 5). Para carregar o gel com as amostras, se tomou 1,5 µl da amostra, onde foram colocados 2 µl de tampão de carga (1000 µl de formamida deionizada, 200 µl de azul dextrano e 100 µl do padrão Genescan 400HD-ROX). Em seguida a amostra era desnaturada a 95 °C durante 2 minutos. O gel foi carregado com 3,5µl da amostra final. No sequenciador automático ABI Prism®377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi realizado a separação por tamanho dos fragmentos obtidos mediante a PCR. O método de elaboração foi realizado segundo recomendações do fabricante. A leitura do gel durava aproximadamente 2 horas.

Tabela 5. Solução de EDTA – pH=8 e 0,5M

Reagentes	Quantidade
H ₂ O destilada	1 l
Tritiplex	186,12g

As informações foram recolhidas e analisadas através do programa Genescan Analysis® versão 3.1.2, que informava os tamanhos dos fragmentos estudados. Eram observadas três cores distintas (azul, verde e amarelo) decorrentes das fluorescências de cada microssatélite, uma quarta cor (vermelha), o Genescan 400HD-ROX, utilizada para marcar o peso molecular padrão, caracterizado por vários fragmentos de 400pb de comprimento, na figura 1 encontra-se o gel referente a leitura da multiplex M7. Os gráficos das bandas obtidas pelo programa Genescan foram analisados pelo programa Genotyper v. 3.7, identificando os diferentes alelos encontrados em cada microssatélite (Figura 2).

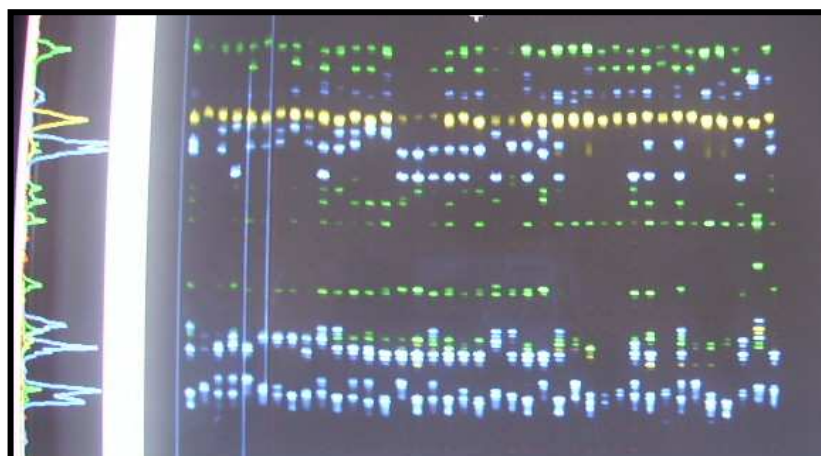


Figura 1. Produtos de amplificação da multiplex M7

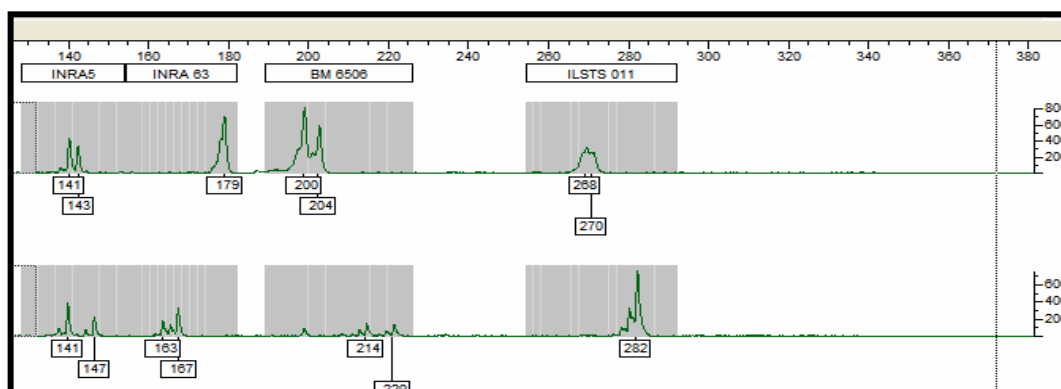


Figura 2. Tipificação dos diferentes alelos presentes em cada um dos microssatélites

2.6. Análise estatística

O cálculo da heterozigosidade para cada um dos microssatélites, para população global e por raça foi realizada através do programa Genetix v.4.03 (Belkhir, 2001). O conteúdo de informação polimórfica (PIC), que informa a qualidade do marcador estudado, foi calculado para cada loco a partir do Microsatellite Toolkit (Park, 2001), com auxílio do Microsoft Excel®, segundo o algoritmo descrito por Bolstein et al. (1980):

$$PIC = 1 - \left[\sum_{i=1}^n p_i^2 \right] \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

onde p_i é a frequência do alelo i^{th} .

Todos os parâmetros analisados consideraram os indivíduos em uma única população.

O teste exato do EHW foi realizado pelo programa Genepop v. 3.1 (Raymond & Rousset, 1995), segundo Guo e Thompson (1992), mediante o algoritmo da cadeia de Monte Carlo Markov (100 batches, 5000 interações e um número de demorization de 10000), o qual permite discriminar os microssatélites em desequilíbrio nas populações. Também foi obtida a probabilidade de exclusão (PE) que representa a probabilidade de um animal escolhido aleatoriamente, não ser o pai/mãe de uma determinada cria (Silva, 2006). A probabilidade de exclusão 1 (PE_1) estima a chance de exclusão quando conhecido o genótipo do filho e de um possível progenitor, já para PE_2 , além dos genótipos citados, tem-se o genótipo de um dos verdadeiros pais. A probabilidade de exclusão combinada para todos os locos é dada por: $PEC = 1 - (1 - PE_n)^k$, sendo n o número de locos avaliados e k a probabilidade de exclusão de cada marcador. As probabilidades de exclusão PE_1 , PE_2 e a PEC (probabilidade de exclusão combinada) foram calculadas através do programa Cervus v. 2 (Marshall et al., 1998), segundo algoritmo de Jamieson (1994).

Com base nos parâmetros supracitados, foram escolhidos microssatélites para compor um novo painel para testes de paternidade em caprinos. Determinou-se a probabilidade de identidade (PI), segundo estabelecido por Paetkau et al. (1995) para cada um dos microssatélites escolhidos em cada população e a probabilidade de identidade combinada. Os resultados foram gerados a partir do programa Identity 1.0 (Wagner e Sefc, 1999), calculada segundo a fórmula:

$$PI = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{j>i} (2p_i p_j)^2$$

Onde: p_i e p_j são as frequências dos alelos i^{th} e j^{th} em uma dada população.

3. RESULTADOS

Todos os locos de microssatélites amplificaram normalmente para algumas algumas populações. Dos 27 microssatélites utilizados, vinte (BM1329, BM1818, CSRD247, SPS115, HSC, MM12, SRCSP8, INRA63, SPS115, TGLA122, CSRM60, CSSM66, McM527, OarFCB11, OarFCB304, MAF65, ETH225 e ETH10, INRA23 e HAUT27) foram propostos pelo ISAG entre 2001 e 2002, para compor painéis de teste de paternidade em bovinos, ovino e caprinos. Desses, os marcadores OarFCB11 e OarFCB304 compõem a lista de microssatélites recomendados pelo MAPA (2004) para esse tipo de teste.

Os microssatélites apresentaram-se polimórficos com grande diferenciação nas frequências alélicas. A média de alelos nas populações exóticas variou de 7,30 (Alpina) a 5,09 (Boer). Já para as populações nativas foram encontrados valores variando de 6,74 (Graúna) a 5,70 (Marota). Para os locos MAF209, HAUT27 e INRA5 verificaram-se monomorfismo em algumas populações (Tabela 7).

Na tabela 6 encontram-se a heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), o número de alelos, o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e a probabilidade de exclusão (PE_1 e PE_2) para os locos analisados. Verificou-se uma heterozigosidade média de 0,7304, com variação de 0,2152 para o loco MAF209 a 0,8891 para o loco CSSM66, sendo este último com maior número de alelos. Verificou-se 21 marcadores com PIC acima de 0,60, com média de 0,699 e heterozigosidade elevadas. Apenas três marcadores (SPS115, MAF209 e ETH225) apresentaram valores baixos de PIC ($<0,50$). O loco MAF209 assim como o ETH225 apresentou polimorfismo baixo, apesar do primeiro ser recomendado para estudo de diversidade em populações caprinas, são marcadores relacionados a espécie ovina.

Na Tabela 7, encontram-se os desvios para o EHW dos marcadores em cada população, onde o marcador CSSM66 apresentou desvio para oito populações. De modo geral, as populações com maiores números de marcadores em desequilíbrio foram as de caprinos locais, como pode ser visto nas populações Moxotó e Marota (Tabela 7). Para as exóticas, a população Alpina apresentou desequilíbrio em sete marcadores. O loco MAF209 não foi observado em quatro populações (Azul, Moxotó, Marota e Graúna) e apresentou-se monomórfico em quatro populações sendo três exóticas (Alpina, Anglo-Nubiana e Saanen) e uma local (Canindé).

Verificou-se no sistema dos 27 microssatélites utilizados uma probabilidade de exclusão combinada de 0,999991 e 0,999999 (PE_1 e PE_2), respectivamente. Considerada alta para teste de paternidade.

Tabela 6. Número de alelos (N_a), número de animais (N^a), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Probabilidade de Exclusão (PE_1 e PE_2) em função dos locos analisados

<i>Locos</i>	N_a	N^a	H_e	H_o	PIC	PE_1	PE_2
CSSM66	29	368	0,8891	0,5924	0,8804	0,646	0,785
SRCSP8	12	376	0,8310	0,6436	0,8099	0,499	0,669
MM12	16	377	0,8242	0,7825	0,8072	0,502	0,672
BM6526	17	374	0,8345	0,7594	0,8210	0,530	0,696
CSRM60	10	371	0,8279	0,7736	0,8058	0,488	0,660
INRA6	13	238	0,8675	0,6639	0,853	0,581	0,737
OarFCB304	18	379	0,8309	0,6596	0,8162	0,520	0,688
HSC	17	344	0,8432	0,7292	0,8265	0,534	0,698
TGLA122	12	379	0,8334	0,7124	0,8115	0,437	0,668
CSRD247	10	379	0,7983	0,6992	0,7697	0,430	0,608
ILSTS11	09	380	0,8117	0,6026	0,7846	0,451	0,627
BM1818	10	364	0,7362	0,6484	0,7163	0,370	0,559
BM8125	08	380	0,7860	0,7158	0,7524	0,402	0,580
BM1329	12	354	0,7518	0,6441	0,7169	0,364	0,543
OarFCB11	15	377	0,7850	0,6870	0,7627	0,431	0,611
MAF65	10	373	0,7705	0,5523	0,7390	0,395	0,573
OarFCB48	09	378	0,7137	0,6296	0,6757	0,321	0,499
BM6506	10	375	0,6614	0,4827	0,6307	0,273	0,457
McM527	09	375	0,7394	0,6213	0,6994	0,343	0,520
INRA23	08	89	0,7156	0,4831	0,669	0,313	0,488
INRA5	08	378	0,6652	0,6481	0,614	0,255	0,423
HAUT27	09	344	0,6229	0,5116	0,578	0,224	0,394
INRA63	06	377	0,6265	0,5066	0,5544	0,215	0,360
ETH10	06	374	0,6691	0,5214	0,5966	0,229	0,379
SPS115	06	376	0,5405	0,4362	0,4353	0,149	0,244
ETH225	04	379	0,4793	0,3826	0,4119	0,117	0,237
MAF209	03	378	0,2152	0,1191	0,2015	0,024	0,110

PE₁: Probabilidade de exclusão com a ausência do genótipo de um dos pais;

PE₂: Probabilidade de exclusão considerando o genótipo dos dois pais.

Na escolha dos microssatélites para o painel, considerou-se as seguintes características: o comportamento quanto ao EHW nas populações, o grau de polimorfismo, as PE₁ e PE₂ considerando as fluorescências e o menor número possível de reações de multiplex que permitisse a leitura em um só gel, com uma configuração econômica e um poder discriminante entre os indivíduos, relativamente alto para o teste de paternidade.

Os microssatélites CSRM60, CSSM66 e INRA6 apesar de apresentarem-se informativos ($PIC > 0,70$) e com número de alelos acima de 10 foram retirados do painel, pois o primeiro requer uma especificação técnica na amplificação, o segundo por apresentar

desequilíbrio em oito das dez populações estudadas e o terceiro por ter apresentado desequilíbrio em quatro populações, além de não amplificar em uma delas (Tabela 7).

Tabela 7. Prova do EHW para os 27 marcadores nas 10 populações

Lócus	ALP	BOER	ANG	SAAN	AZUL	MOX	MARO	CANI	REP	GRAU	Tot ²
BM1329									*	*	2
BM6506		*									1
BM8125						*					1
BM1818						*					1
CSR247											0
HSC	*					*	*				3
MM12							*				1
OarFCB48	*										1
SRCSP8	*			*		*				*	4
INRA63								*			1
MAF209	1	*	1	1	-?	-?	-?	1		-?	1
ILSTS11								*			1
SPS115					*	*					2
TGLA122							*	*			2
BM6526											0
CSRM60							*				1
CSSM66	*	*	*	*	*			*	*	*	8
McM527											0
OarFCB11											0
OarFCB304		*		*			*		*		4
MAF65	*				*	*	*			*	5
ETH225									*		1
ETH10					1	*					1
INRA23	-?	-?	-?		*	*	-?	-?		-?	2
INRA5				1	*		1		1		1
INRA6	*		*		*	*				-?	4
HAUT27	*	*		1			*	1	*		4
Total ³	7	5	2	3	6	9	7	4	5	4	

* P<0,05; - (marcador não amplificado); 1 – marcadores monomórficos nas populações; -? – alelos não observados na população; Tot² – Total de populações com desvio para o marcador; Total³ - marcadores em desequilíbrio para a população.

Na Tabela 8 encontram-se os marcadores candidatos ao painel para identificação nas populações de caprinos locais e exóticas, levando-se em conta os resultados obtidos, o que possibilitou a formação de duas multiplex em cada painel.

Tabela 8. Painel de microssatélites para emprego em teste de paternidade, multiplex, tamanho dos alelos e número de alelos (Na) por locos

Painel de Caprino Local			Painel Caprino Exótico		
<i>Multiplex 1</i>	<i>Tamanho alélico</i>	<i>Na</i>	<i>Multiplex 1</i>	<i>Tamanho alélico</i>	<i>Na</i>
BM8125	100-128	08	BM8125	100-128	08
MM12	85-135	16	MM12	85-135	16
CSR247	208-250	10	CSR247	208-250	10
OarFCB304	130-180	18	OarFCB304	130-180	18
<i>Multiplex 2</i>			<i>Multiplex 2</i>		
BM1818	254-290	10	BM6506	190-228	10
BM6526	145-195	17	BM6526	145-195	17
SRCRSP8	210-260	12	SRCRSP8	210-260	12
BM1329	153-185	12	BM1329	153-185	12
HSC	270-306	17	HSC	270-306	17

Os locos escolhidos são independentes e localizados em cromossomos distintos, o que pode ser observado na tabela 3. A escolha também se baseou nas marcas fluorescentes, de forma que os locos marcados com a mesma fluorescência não possuíssem fragmentos de tamanhos sobrepostos, sendo este um dos motivos de descarte do microssatélite TGLA122 do painel. O número de alelos variou de 8 a 18 para os microssatélites escolhidos, pois o grau de polimorfismo é um ponto importante em estudos de paternidade

O painel proposto consta de oito microssatélites, considerados muito informativos, comuns a ambos os grupos de caprinos (locais e exóticos). Para esse grupo de microssatélites a probabilidade de exclusão combinada foi de 0,99430 e 0,9997 (PE_1 e PE_2), de forma que esse grupo de microssatélites pode constituir um painel para teste de paternidade em caprinos. No painel proposto observa-se que o marcador BM1818 foi o mais informativo nas populações nativas. Já para o painel de animais exóticos, o marcador BM6506 foi o mais informativo. Compondo um painel com nove marcadores para o exótico e o local.

Observa-se que a heterozigotidade variou de 0,524 a 0,878 no grupo exótico, e de 0,490 a 0,836 para o grupo nativo para o conjunto de nove microssatélites propostos no painel (Tabela 9 e 10). Com base nestes painéis foi possível avaliar a capacidade de discriminar indivíduos, sendo a probabilidade de identidade um estimador de identificação individual, ou a probabilidade de que dois indivíduos tirados ao acaso de uma população tenham genótipos idênticos em vários locos (Paetkau et al., 1995; Waits et al., 2001). A probabilidade de identidade combinada variou de $1,08 \times 10^5$ a $1,67 \times 10^8$ para os caprinos exóticos, e para os caprinos locais de $1,5 \times 10^6$ a $1,89 \times 10^7$ (Tabela 9 e 10). Percebe-se que o cálculo das probabilidades de identidade dentro das populações possui a capacidade de discriminar um indivíduo entre um milhão (10^6). Considerando os microssatélites comuns às raças exóticas e

às populações nativas, o poder de discriminação para o painel exótico foi de 6×10^8 , e para o painel de caprinos locais de $8,7 \times 10^6$.

Tabela 9. Heterozigosidade esperada (H_e), Probabilidade de identidade (PI) e discriminação ($1/PI$) com o painel exótico

Populações	Microssatélites	H_e	PI	$1/PI$
<i>Azul</i>	BM1329	0.751	0,187748	5,326884
	BM8125	0.766	0,165646	6,036970
	CSR247	0.560	0,275654	3,627736
	HSC	0.788	0,131722	7,591746
	MM12	0.655	0,237584	4,209037
	SRCRSP8	0.663	0,286524	3,490109
	OarFCB304	0.836	0,085594	11,683061
	BM6526	0.736	0,182112	5,491126
	BM1818	0.694	0,181892	5,497767
PI combinado			$2,17 \times 10^{-7}$	$4,58 \times 10^6$
<i>Canindé</i>	BM1329	0.777	0,155383	6,435710
	BM8125	0.732	0,197429	5,064342
	CSR247	0.764	0,140655	7,109594
	HSC	0.722	0,198984	5,025529
	MM12	0.715	0,179554	5,569355
	SRCRSP8	0.720	0,191305	5,227254
	OarFCB304	0.783	0,140421	7,121441
	BM6526	0.594	0,234940	4,256405
	BM1818	0.796	0,128842	7,761444
PI combinado			$1,253 \times 10^{-7}$	$7,97 \times 10^6$
<i>Graúna</i>	BM1329	0.796	0,134519	7,433894
	BM8125	0.743	0,184258	5,427172
	CSR247	0.507	0,310371	3,221950
	HSC	0.779	0,141544	7,064941
	MM12	0.738	0,181174	5,519555
	SRCRSP8	0.704	0,238387	4,194859
	OarFCB304	0.834	0,086165	11,605640
	BM6526	0.766	0,130583	7,657964
	BM1818	0.694	0,165289	6,050009
PI combinado			$8,74 \times 10^{-8}$	$1,14 \times 10^7$
<i>Marota</i>	BM1329	0.694	0,276262	3,619752
	BM8125	0.705	0,230971	4,329547
	CSR247	0.672	0,246615	4,054903
	HSC	0.813	0,110652	9,037342
	MM12	0.654	0,220368	4,537863
	SRCRSP8	0.713	0,224800	4,448398
	OarFCB304	0.629	0,218934	4,567586
	BM6526	0.804	0,109747	9,111866
	BM1818	0.490	0,319733	3,127609
PI combinado			$6,626 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^6$

Tabela 10. Heterozigosidade esperada (H_e), Probabilidade de identidade (PI) e discriminação ($1/PI$) das seis populações caprinas brasileiras

Raças	Microssatélites	H_e	PI	$1/PI$
<i>Alpina</i>	BM1329	0,705	0,187390	5,336460
	BM6506	0,829	0,095333	10,489547
	BM8125	0,765	0,163298	6,123773
	CSRD247	0,612	0,243064	4,114142
	HSC	0,805	0,118895	8,410782
	MM12	0,745	0,054622	18,307641
	SRCRSP8	0,778	0,141294	7,077441
	OarFCB304	0,817	0,098319	10,170974
	BM6526	0,825	0,093567	10,687528
PI combinado			$5,98 \times 10^{-9}$	$1,67 \times 10^8$
<i>Anglo-Nubiano</i>	BM1329	0,699	0,230028	4,347296
	BM6506	0,538	0,301984	3,311433
	BM8125	0,611	0,223547	4,473332
	CSRD247	0,795	0,131593	7,599188
	HSC	0,786	0,134580	7,430524
	MM12	0,577	0,391465	2,554067
	SRCRSP8	0,725	0,222043	4,503632
	OarFCB304	0,599	0,258558	3,867604
	BM6526	0,737	0,192338	5,199180
PI combinado			$1,18 \times 10^{-6}$	$8,41 \times 10^5$
<i>Boer</i>	BM1329	0,524	0,567182	1,763102
	BM6506	0,534	0,400010	2,499935
	BM8125	0,534	0,329740	3,032692
	CSRD247	0,558	0,474004	2,109686
	HSC	0,773	0,12510	7,993605
	MM12	0,768	0,160191	6,242547
	SRCRSP8	0,697	0,243051	4,114362
	OarFCB304	0,535	0,483978	2,066209
	BM6526	0,799	0,110092	9,083312
PI combinado			$9,20 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^5$
<i>Saanen</i>	BM1329	0,631	0,22743	4,396957
	BM6506	0,792	0,137464	7,274632
	BM8125	0,746	0,192703	5,189332
	CSRD247	0,721	0,185230	5,398693
	HSC	0,842	0,074693	13,388135
	MM12	0,878	0,051177	19,540027
	SRCRSP8	0,656	0,285231	3,505930
	OarFCB304	0,768	0,153619	6,509611
	BM6526	0,818	0,094889	10,538629
PI combinado			$1,77 \times 10^{-8}$	$5,64 \times 10^7$

Continuação Tabela 10.

<i>Moxotó</i>	Microssatélites	H _e	PI	1/PI
	BM1329	0.624	0,358227	2,791526
	BM8125	0.702	0,257268	3,886997
	CSR247	0.743	0,186259	5,368868
	HSC	0.675	0,225683	4,430993
	MM12	0.796	0,122275	8,178266
	SRCRSP8	0.727	0,203621	4,911081
	OarFCB304	0.680	0,214080	4,671150
	BM6526	0.675	0,191977	5,208957
	BM1818	0.783	0,131466	7,606529
PI combinado			5,21x10 ⁻⁷	1,91x10 ⁶
<i>Repartida</i>				
	BM1329	0.616	0,298175	3,353735
	BM8125	0.662	0,259813	3,848922
	CSR247	0.769	0,155796	6,418650
	HSC	0.797	0,124468	8,034193
	MM12	0.819	0,103444	9,667066
	SRCRSP8	0.798	0,126115	7,929271
	OarFCB304	0.746	0,118330	8,450942
	BM6526	0.698	0,173031	5,779311
	BM1818	0.786	0,131660	7,595321
PI combinado			5,28x10 ⁻⁸	1,89x10 ⁷

4. DISCUSSÃO

Todos os microssatélites empregados neste estudo apresentaram polimorfismo, exceto os marcadores MAF209, ETH10, INRA5 e HAUT27, monomórficos em algumas populações. Na Tabela 6, observou-se que os microssatélites com menor número de alelos também apresentaram $PIC < 0,50$. Os resultados corroboram com os reportados por Menezes et al. (2006) em estudos de diversidade genética de cabras Oliveira (2007), com caprinos locais da raça Moxotó, e Luikart et al. (1999) avaliando caprinos espanhóis (Murciano –Granadina) e da raça Saanen. Martínez et al. (2005) encontraram resultados semelhantes para três marcadores (ETH10, INRA5 e HAUT27) em estudos de caracterização da cabra Murciano-Granadina. Os mesmos autores ressaltaram a importância de levar em conta a utilização destes marcadores em estudos posteriores de variabilidade genética.

O marcador MAF209 revelou poucos alelos com pouco polimorfismo para as populações estudadas. Menezes et al. (2006) e Luikart et al. (1999) encontraram resultados semelhantes para este loco. Os autores relatam que este marcador foi estudado primeiramente em ovinos e, provavelmente encontra-se em uma zona de baixa variabilidade genética em caprinos.

As médias das frequências alélicas encontradas nos caprinos locais foram inferiores as reportadas por Li et al. (2002), estudando raças de cabras nativas chinesas (6,90). Para Buchanan et al. (1994) as diferenças que ocorrem nas frequências alélicas entre populações indicam se os marcadores podem ser utilizados para identificar ou alocar indivíduos dentro de raças ou a região de origem. O nível de polimorfismo encontrado nos microssatélites resulta das taxas de mutações que alteram o comprimento destes marcadores, sendo a inserção e deleção as principais fontes dessas mudanças (Schlötterer e Tautz, 1992). Assim, o número de alelos encontrados no marcador influenciará diretamente na heterozigidade esperada e PIC (Curi, 2000).

A eficiência no teste de paternidade não depende apenas do número de marcadores utilizados, mas do nível de informação que estes fornecem a qual é determinada pelos valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de exclusão e heterozigidade. Estes valores dependem do número de alelos e da frequência de distribuição destes alelos nas populações (Curi et al., 2002).

Os valores de PIC para os locos ILST11 e OarFCB48, para a raça Moxotó, foram inferiores ($PIC < 0,50$) aos obtidos por Araújo (2004), verificando a paternidade em caprinos

das raças Alpina, Saanen e Moxotó, por meio de sistemas de microssatélites de DNA. Já para as raças Saanen e Alpina os valores se assemelham ($PIC > 0,70$).

Os resultados de PIC, número de alelos, PE_1 , PE_2 e heterozigidade para o marcador OarFCB304, foram superiores aos de Paiva et al. (2004) estudando o mesmo marcador em ovinos, que obtiveram probabilidade de exclusão de 0,9984 e 0,9999 (PE_1 e PE_2) com sistema de 18 locos. Em relação ao microssatélite SRCRSP8, Santos-Silva et al. (2005) obtiveram $PIC < 0,50$, com painel de 12 microssatélites para verificação de paternidade em ovinos da raça Serra da Estrela. Este resultado foi contrário ao encontrado em nosso trabalho, com PIC superior a 0,50, podendo este marcador, de acordo com os demais resultados obtidos, referentes à PE, heterozigidade e equilíbrio, ser utilizado em estudos com caprinos.

Os resultados obtidos para o EHW foram semelhantes aos encontrados por Santana (2005) ao estudar caprinos espanhóis, tendo observado desequilíbrio apenas para o marcador CSSM66. Segundo Martínez et al. (2004) este comportamento se deve a grande quantidade de alelos e as possíveis frequências que são encontradas neste marcador. Também, este desequilíbrio pode ser devido a subdivisão dentro das populações (efeito Wahlund), acasalamentos dirigidos, antepassados comuns, seleção natural, migração ou fluxo de genes a partir de populações externas.

As probabilidades de exclusão PE_1 e PE_2 encontradas no sistema de oito marcadores foram superiores às de Araújo (2004) com 0,98837 e 0,99959 (PE_1 e PE_2). Os marcadores BM1818 e BMM6506 apresentaram-se em diferentes painéis (o primeiro compondo o painel nativo e o segundo exótico), o que permitiu ao final, nove marcadores para cada painel de paternidade. Esses marcadores foram também apresentados no painel Espanhol proposto por Santana (2005), indicando que são muito informativos, podendo ser utilizado em estudos genéticos dessa natureza de raças caprinas em geral.

No painel proposto apenas o marcador OarFCB304 faz parte dos marcadores propostos pelo MAPA para teste de paternidade. A IN n. 74 de 2004 do MAPA, exige a utilização de 8 marcadores microssatélites (OarCP49, OarFCB11, OarAE129, OarFCB304, MAF 214, HISTOCOMP. Complex (Hcc) SPS113 e D5S2) para credenciamento de laboratórios para a realização de teste de identificação genética de animais por análise de DNA.

Araújo (2004) propôs o uso de um painel com onze marcadores microssatélites visando à confirmação de paternidade nas raças Saanen, Alpina e Moxotó.

O desenvolvimento de painéis que permitam uma resolução satisfatória vem sendo proposto por outros pesquisadores. Martínez et al. (2005a) a partir de um painel de 22 marcadores microssatélites, desenvolveram um painel de doze microssatélites para cabras Murciano-Granadina, com probabilidade de exclusão combinada (PEC) de 0,99999. Já Martín et al. (2005) propuseram um painel de dez microssatélites para aplicação em rastreabilidade de caprinos locais espanhóis da raça Braca Andaluza.

Curi et al. (2002) estudando a viabilidade de aplicação de determinados locos microssatélites para teste de paternidade em bovinos da raça Gir, observou PEC de 0,9789, valor este considerado não adequado para teste de paternidade. Martínez et al. (2005b) a partir dos dados de 24 microssatélites, desenharam um painel básico com 12 microssatélites, cuja probabilidade de exclusão combinada *a priori* foi de 0,9984, para ovelhas Palmera e, um painel adicional de 6 microssatélites para controle de filiação para os casos onde não se pode resolver com o painel básico, sendo a PEC para os dois painéis apresentados de 0,99999. Buchanan et al. (1994) analisaram seis populações de ovelhas com um painel de 8 microssatélites e obtiveram 98% de certeza de que um animal poderia pertencer a uma determinada raça.

A utilização de conjuntos de *primers* em uma mesma reação de PCR (*PCR multiplex*) requer o estabelecimento de condições necessárias para a amplificação, levando-se em conta vários fatores, como a escolha e o desenho do *primer*; quantidades a serem utilizadas em uma mesma reação, ajustando as concentrações de enzima, tampão, tempo, equilíbrio das regiões a serem amplificadas; o tamanho relativo dos fragmentos; a dinâmica dos *primers*; e a otimização da técnica da PCR para muitos fragmentos. Todos esses aspectos encontra-se detalhadamente em Chamberlain *et al.* (1988), Edwards e Gibbs (1994), Dzialuk et al. (2005), Martínez (2005a). Alguns sistemas de PCR multiplex podem ser tão simples como combinar dois conjuntos de *primers* para uma reação, outros devem ser desenvolvidos com cuidados para a região a ser amplificada, o tamanho dos fragmentos, da dinâmica dos *primers*, e a otimização da técnica da PCR para acomodar múltiplos fragmentos, além do uso de fragmentos de DNA marcados com fluorescências (Edwards e Gibbs, 1994; Dzialuk et al., 2005).

O uso de PCR multiplex reduz o tempo e custo de análise, bem como o número de marcadores utilizados, com grau de polimorfismo que permita a verificação da paternidade, na confirmação de parentesco duvidoso. Luikart et al. (1999) desenvolveram dois sistemas de multiplex contendo cada um onze locos microssatélites para teste de paternidade em caprinos

e obtiveram probabilidade de exclusão maior que 0,99999 para rebanhos caprinos da Casemira, 0,99999 para as raças Angorá e Murciano-Granadina, e de 0,99997 para a raça Saanen. Resultado semelhante de probabilidade de exclusão também foi encontrado para a raça Saanen, neste trabalho. Souza et al. (2006) encontraram PE_1 e PE_2 de 0,999999 e 0,999989, para 23 locos microssatélites em populações de ovinos Santa Inês, respectivamente. Pariset et al. (2003) avaliaram satisfatoriamente o índice de consanguinidade com 11 marcadores microssatélites em 17 rebanhos de ovelha Sarda nativa da Itália, auxiliando na manutenção dos estoques dessa raça.

Já Silva (2006), analisando duas espécies de porcos-do-mato (Cateto e Queixada), encontrou probabilidade de exclusão combinada de 0,9948. Este valor foi considerado satisfatório para catetos. A probabilidade obtida para queixadas, apesar de ter sido considerada alta (0,9553), não foi satisfatória, pois os valores mínimos de exclusão de paternidade devem ser iguais ou superiores a 0,99. Giacomoni (2002), com um sistema de quatro locos microssatélites, obteve probabilidade de exclusão de 0,93 em cavalos pantaneiros, considerada satisfatória, e para cavalos crioulos, a probabilidade de exclusão combinada foi muito baixa (0,74). Usha et al. (1995) obtiveram probabilidade de exclusão de 0,99 utilizando um sistema de cinco microssatélites para teste de paternidade em bovinos. A grande divergência entre as probabilidades de exclusão obtidas para as diferentes espécies se deve ao fato de se utilizar marcadores distintos. Além disso, dentro de raça/espécie cada indivíduo representa uma combinação única de genes.

Os resultados da probabilidade de identidade encontrados para as populações de caprinos locais avaliadas neste estudo apresentaram-se próximas as de Paetkau et al. (1995) estudando a estruturação da população de urso polar encontrou probabilidade de identidade combinada em torno de $1,0 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-7}$. A probabilidade de identidade (PI) do sistema proposto neste trabalho (Tabela 9 e 10) foram inferiores as de Santana (2005), que encontrou probabilidade de discriminação de um indivíduo entre um bilhão (10^{12}) e, Luikart et al. (1999) avaliando quatro raças caprinas (Casemira, Angorá, Saanen e Murciano-Granadina) encontrou PI para o conjunto de multiplex em cada população de $2,3 \times 10^{-19}$, 5×10^{-19} , $1,4 \times 10^{-15}$ e $2,3 \times 10^{-17}$.

5. CONCLUSÃO

O painel de microssatélites definido neste estudo mostrou-se útil para resolver casos paternidade em caprinos.

Pode ser empregado no monitoramento e controle de rebanhos caprinos, podendo ser utilizado para organizar esquemas de acasalamentos, em casos de paternidades duvidosas.

Pode ser uma ferramenta útil em programas de conservação de raças, bem como pode servir de base para estudos com outras raças caprinas, como um método econômico, viabilizando custo e tempo de análise.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, A. M. (2004). *Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA*. 2004. 104 fls. Tese. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa.

Barendse., W.; Armitage, S.M. (1994). A genetic linkage map of bovine genome. *Nature Genetics*. v. 6, pp.2727-235.

Belkhir k. et al. (2001). *GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)*.

Bishop, M. D.; Kappes, S, M. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. v. 136, pp. 619-639.

Bolstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* v. 32, pp. 314–331.

Buchanan, F. C.; Adams, L. J.; Littlejohn, R. P. et al. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, v. 22, pp. 397-403.

Carneiro, P.L.S.; Euclides, R. F.; Almeida e Silva, M.; Lopes, P. S.; Torres, R. A.; Torres Filho, R. A.; Carneiro, A. P.S. (1999). Efeito de erros de pedigree na seleção. *Ver. Bras. Zootec.* v. 28, n. 2, pp. 269-274.

Chamberlain, J. S.; Gibbs, R. A.; Ranier, J. E.; Nguyen, P. N.; Caskey, C. T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Research*. v. 16, pp. 11141-11156.

Curi, R.A. *Teste de paternidade por microssatélites em bovinos da raça Gir*. Botucatu, 2000. 89p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

Curi, R. A.; Lopes, C. R. (2002). Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovines. *Braz. J. vet. Res.anim.Sci.* v. 39, n. 3, pp.129-135.

Delgado, J. V. (2002). Gestión genética de las poblaciones III: Conservación, Preservación y Mejora. Planificación y programación de la conservación: Organización del substrato; recogida de la información; selección de reproductores. Planificación de los apareamientos. *In: III Curso Internacional Sobre la Conservación e Utilización de la Razas de Animales Domésticos Locales en Sistemas de Explotación Tradicionales*. 23 de septiembre a 18 de octubre de 2002, Córdoba - Espanha.

DeNise, S., Johnston E., Halverson, Marshall J., K., Rosenfeld D., McKenna, S., Sharp, T. and Edwards, J. (2004). Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. International Society for Animal Genetics. *Animal Genetics*. v. 35, pp. 14–17

Dzialuk, A.; Chybicki, I.; Burczyk, J. (2005). PCR Multiplexing of Nuclear Microsatellite Loci in *Quercus* Species. *Plant Molecular Biology Reporter*. n. 23, pp. 121–128.

Edwards, M. C.; Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Res*. v. 3, pp. S65-S75.

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

Georges, M.; Massey, J.M. (1992). Polimorphic DNA markers in Bovidae. Patent In: *WO Publication* (Ed by Org. WIP) Geneva.

Giacomoni, E.H. (2002). *Variabilidade genética em duas raças de equinos (Equus caballus – Equidae) – Crioulo e Pantaneiro – Avaliada através do marcador de DNA*

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

Guo, S.W.; Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*. v. 48, pp. 361-372.

Jamieson, A. (1994). The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics*. v. 25, pp. 37-44.

Li, M.; Zhao, S.; Bian, C.; Wang, H.; Wei, H.; Liu, B.; Yu, M.; Fana, B.; Chen, L.; Zhu, M.; Li, S.; Xiong, T.; Li, K. (2002). Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis. *Genet. Sel. Evol.* v. 34, pp. 729-744.

Lins, T.C.L.; Soares, C.N.; Guimarães, C.S.; Ribeiro, M.A.N.; Diener, P.S.A.; Ferreira, M.E.; Gattaplaglia, D. (2006). *Diversidade alélica e desempenho forense de um conjunto de multiplex de 11 marcadores microssatélites em populações bovinas de Nelore e Gir (Bos indicus)*. Genomax. Tecnologia Genômica.

Luikart, G.; Biju-Duval, M.P.; Ertugru, O. (1999). Power of 22 microsatellite marker in fluorescent multiplex for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics*. v. 30, pp. 431-438.

Marshall, T.C.; Slate, J.; Kruuk, L.; Pemberton, J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, v.7, n.5, pp. 639-655.

Marshall, T.C.; Sunnucks, P.; Spalton, J. A.; Greth, A.; Pemberton, J.M. (1999) Use of genetic data for conservation management: the case of the Arabian oryx. *Animal Conservation*. v. 2, pp. 269-278.

Martínez, A.M., Carrera, M. P., Acosta, J.M., Rodríguez-Gallardo, P.P., Cabello, A., Camacho, M.E., Delgado, J.V. (2004). Genetic characterisation of the Blanca Andaluza

Goats base don microsatellite markers. *South African Jour. Of Anim. Sci.* v.34, n. 1, pp. 17-19.

Martínez, A.M.; Vega-Pla, J.L.; Lozano, J.M.; Carrera, M.P.; Acosta, J.M.; A. Cabello. (2005a). Caracterización genética de la cabra Murciano-Granadina con microssatélites. *Arch. Zootec.* v.54, pp. 327-331.

Martínez, A.M.; Vega-Pla, J.L.; Bravo, M.J.; Barba, C.; Caraballo, J.; Delgado, J.V. (2005b). Caracterización genética de la oveja Palmera con microsatélites. *Arch. Zootec.* v. 54, pp. 363-367.

Menezes, M. P. C.; Martínez, A. M.; Ribeiro, M.N.; Pimenta Filho, E.C.; Bermejo, J. V. D. (2006). Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando 27 marcadores microssatélites. *R. Bras. Zootec.* v.35, n.4, p.1336-1341.

Mommens, G.W.; Coppieters, A. (1994). Dinucleotide repeat polymorphism at the bovine MM12E6 and MM8D3 loci. *Animal Genetics.* v. 25, p. 368.

Moore, S.S.; Byrne, K. (1993). Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome.* v. 5, p. 84-90.

Oliveira, J.C.V. (2007). *Variabilidade Genética em Caprinos.* 104 f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia, Recife, Pernambuco.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling't, I.; Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology.* v. 4, pp. 347-354.

Pariset, L.; Savarese, M. C.; Cappuccio,I.; Valentini, A. (2003). Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *Jour. Anim. Breed. Genetic.* v. 120, pp. 425-232.

Raymond, M. and F. Rousset (1995). Genepop: populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity.* v. 86, pp. 248-249.

Santana, D.M. (2005). *Estudio de los microsatelites de AND para el incremento en la mejora y trazabilidad de los productos agroalimentarios procedentes del caprino*. Fundación Canaria Doctor Manuel Morales. Laboratorio de Genética Molecular Aplicada. Diputación de Córdoba. Departamento de genética Universidad de Córdoba.

Schlötterer, C.; Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* v. 20, pp. 211-215.

Silva, R. W. (2006). *AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Tayassu tajacu* (CATETO) E *Tayassu pecari* (QUEIXADA) POR MEIO DA UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES*. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética, curso de Pós Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Solinas-Toldo, S.; Fries, R. (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome.* v. 4, pp. 720-727.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research.* v. 17, pp. 6463-6471.

Thieven, U.; Solinas-Toldo, S. (1997). Polymorphic CA-microsatellites for the integration of the bovine genetic and physical map. *Mammalian Genome.* v. 8, pp. 52-55.

Tommasini, L.; Batley, J; Arnold G.M; Cooke, RJ; Donini P; Lee D.; Law, JR; Lowe C; Moule C.; Trick, M; and Edwards K.J. (2003). The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor Appl. Genet.* v.106, pp. 1091-1101.

Usha, A. P.; Simpson, S.P.; Williams, J.L. (1995). Probability of random sire exclusion using microsatellite markers parentage verification. *Animal Genetics.* v. 26, pp. 155-161.

Vaiman D.; Mercier D.; Moazami-Goudarzi K.; Eggen A.; Ciampolini R.; Lépling A.; Velmala R.; Kaukinen J.; Varvio S.L.; Martin P.; Levéziel H.; Guérin G. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome.* v.5, pp. 288-97.

Waits, L.P.; Luikart, G.; Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*. n.10, pp. 249-256.

Walsh, P. S.; Metzger, D. A.; Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for a simple extraction of DNA for PCR-based typins from forensic material. *Biotecchniques*. v. 10, pp. 506-513.

Yang, L.; Zhao S. H.; Li, K. ; Peng, Z.Z; Montgomery, G.W. (1999). Determination of relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. *Animal Genetics*. v. 30, n. 6, pp. 452-456.

6.1. Referências da web

Araújo, A.M.; Simone, E.; FAcioni, G.; Pereira, C.S.; Lopes, P. S.; Rodrigues, M.T.; Columbiana, V.S. (2004). Paternidade em rebanhos caprinos por meio de microssatélites de DNA. *Simpósio da Soc. Brás. Melhoramento Animal*. 2004. Pirassununga – SP. <http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/trabalhos/biomolecular/bm016.pdf>

Curi, R. A.; Lopes, C. R. (2001). Teste de paternidade em bovinos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* - n° 21 - julho/agosto 2001.<
http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio21/21_8.pdf> .Acesso em: 13/10/2008.

FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. (2008). DOMESTIC ANIMAL DIVERSITY INFORMATION SYSTEM <<http://dad.fao.org>> .
<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/es/A5.html>

ISAG. (2002). <http://www.isag.org.uk> 2002.

MAPA. (2004). **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 74 de 20 de outubro de 2004. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>.

Martín, D.; Martínez, A.; Camacho, M^a. E.; Cabello, A.; Delgado, J. V. (2005). Empleo de microssatélites del ADN para la trazabilidad de la raza caprina Blanca Andaluza. **VI**

Simposio Iberoamericano sobre la Conservación Utilización de Recursos Zoogenéticos. San Cristóbal de las Casas, Chiapas - México. <http://www.cytcd.unach.mx/>

Park, S. D. E. (2001). **Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection** [Ph.D. thesis] University of Dublin. stephen.park@ucd.ie

Paiva, S.R.; Faria, D.A.; Silvério, V.C.; Sollero, B.P.; Paixão, D.M.; MAcmanus, C.; Egito, A.A.; Dergam, J.A.; Guimarães, S.E.F.; Castro, S.T.R.; Albuquerque, M.S.N.; Mariante, A.S. (2004). Viabilidade de locos microssatélites para exclusão de paternidade em raças de ovinos. **V Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal.** SBM. Pirassununga – SP. <http://www.sbmaonline.org.br/anais/v/trabalhos/biomolecular/bm018.pdf>

Santos-Silva, F.; Lopes, A. I.; Carolino, M. I.; Dinis, R.; Gama, L. T. da. (2005). Utilidade de um conjunto de 12 microssatélites na análise da variabilidade genética e verificação de paternidades na raça ovina Serra da Estrela. **VI Simposio Iberoamericano sobre la Conservación Utilización de Recursos Zoogenéticos.** San Cristóbal de las Casas, Chiapas - México. <http://www.cytcd.unach.mx/>

Souza, C.A., Paiva, S.R., Faria, D.A., McManus, C.M., Oliveira, A.A., Grattapaglia, D., Castro, S.T.R., Egito, A.A., Albuquerque, M.S.M., Mariante, A. S. (2006). DIVERSIDADE GENÉTICA DE 23 LOCOS STRs EM CINCO POPULAÇÕES DE OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS. XI ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA 2006. **Anais.** <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/tales2006.pdf>

Wagner, H. W.; Sefc, K. M. (1999). **Identity.** <<http://www.boku.ac.at/zag/identity>>



CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

Diversidade e estrutura genética de populações caprinas locais brasileiras e exóticas

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética de 14 populações de três grupos; caprinos locais brasileiros, exóticos e espanhóis, e a estruturação destas populações. Foram realizadas análises de DNA de bulbo capilar e, em seguida através de 23 marcadores microsatélites foram realizadas as análises de variabilidade genética, o EHW, os estatísticos F (F_{ST} , F_{IS} , F_{IT}), variância molecular (AMOVA), distâncias baseadas no F_{ST} , efeito de “gargalo genético”, este apenas para as populações de caprinos locais e, a análise de inferência bayesiana para verificar a estruturação das 14 populações, cujos animais foram designados probabilisticamente à população de origem, através do programa Structure. Os marcadores utilizados apresentaram-se polimórficos com boas proporções de alelos, exceto os marcadores MAF209 e ETH225, com 3 e 4 alelos. As populações que apresentaram maiores quantidades de marcadores em desvios para o equilíbrio EHW foram as que apresentaram valores de F_{IS} acima de 0,10, como é o caso da SRD e da Moxotó. Pela AMOVA, verificou-se maior variação entre os indivíduos, seguida das diferenças entre os grupos, indicando a existência de subpopulações dentro dos grupos. Os valores altos de F_{ST} refletiram boa diferenciação genética dentro e entre as 14 populações estudadas, separando-as em três grupos principais, caprinos locais brasileiros, exóticos e espanhóis. De acordo com os valores de F_{ST} , maiores distâncias genéticas foram observadas entre grupos, principalmente das exóticas com locais e destes com as espanholas. Apenas as populações SRD, Graúna e Moxotó apresentaram efeito “gargalo genético”. Com base na inferência bayesiana foi possível propor treze populações ($k=13$), se verificado subdivisão nas populações locais, com alguns indivíduos agrupados a múltiplos *clusters*, a exemplo das seis populações de caprinos locais (Moxotó, Azul, Marota, Canindé, Graúna e Repartida). Nas raças exóticas, a Saanen apresentou proporções de designação próximas (40,4 e 44,5%) em dois *clusters* e, a Alpina também se agrupou em dois *clusters*, com maiores proporções em um (>70%). As raças Anglo-Nubiana e Boer agruparam-se em diferentes *clusters*, com proporções acima de 90%. Das três populações espanholas, a Murciano-Granadina agrupou-se sempre com a Murciana e Granadina, como esperado, uma vez que essa é resultado do cruzamento das duas raças citadas. Verificou-se que os caprinos locais apresentaram mediano grau de diversidade e distantes das raças exóticas, porém, alguns caprinos apresentaram-se próximos. Estudos desta natureza permitem definir o grau e ameaça das raças e delinear estratégias de conservação e melhoramento genético adequados a cada situação.

Palavra-chave: Variabilidade genética, estruturação populacional, inferência bayesiana e conservação.

Summary

The aim of the present study was to investigate the genetic diversity of 14 goat populations distributed among three groups (local Brazilian, exotic and Spanish goats) and determine genetic structuring in these populations. Hair bulb DNA analysis was carried out and 23 microsatellite markers were used for the analysis of genetic variability, Hardy-Weinberg (HW) equilibrium, F statistics (F_{ST} , F_{IS} , F_{IT}), molecular variance (AMOVA), distances based on F_{ST} and genetic bottleneck effect, the latter of which was only tested in local goat populations. Bayesian inference analysis was also performed to determine the genetic structuring of the 14 populations. The Structure program was used to probabilistically designate the animals to their population of origin. The markers used were polymorphic and had good proportions of alleles, except the MAF209 and ETH225 markers, which had 3 and 4 alleles, respectively. The populations that had the most number of markers that deviated from HW equilibrium were those with F_{IS} values above 0.10, such as the local undefined breed and Moxotó breed. AMOVA revealed greater variation between individuals, followed by differences between groups, indicating the existence of sub-populations within the groups. The high F_{ST} values reflect the good genetic differentiation between and within the 14 populations studied, separating them into the three main groups (local Brazilian, exotic and Spanish goats). Based on the F_{ST} values, there were greater genetic distances between groups, especially between the local and exotic groups and the local and Spanish groups. Only the Graúna and Moxotó populations exhibited a genetic bottleneck effect. Based on Bayesian inference, thirteen populations were proposed ($k=13$) considering the subdivision in the local populations, with some individuals grouped in multiple clusters, as occurred in six local populations (Moxotó, Azul, Marota, Canindé, Graúna and Repartida). In the exotic breeds, the Saanen breed had similar designation proportions (40.4 and 44.5%) in two clusters; the Alpine breed was also grouped in two clusters, with greater proportions in one (>70%); the Anglo-Nubian and Boer breeds were grouped in different clusters, with proportions above 90%. Among the three Spanish populations, the Murciano-Granadina breed was always grouped with the Murciana and Granadina breeds, which was expected, as the former is the result of the crossbreeding of the latter two. The local populations exhibited a median degree of diversity and were distant from the exotic breeds, but some goats were more closely related. Studies of this nature define the degree and threat of breeds and can contribute to the delineation of conservation and genetic improvement strategies that are adequate for each situation.

Keyword: Genetic variability, population structure and conservation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui diversas raças de animais domésticos que se desenvolveram a partir dos animais trazidos pelos colonizadores, que durante os últimos cinco séculos, se adaptaram as condições encontradas nas diversas regiões do país.

A espécie *Capra hircus* encontra-se difundida em todo o mundo, desempenhando papel importante como fonte de alimento para a população humana em diversos países. Estudar a constituição genética das raças e ecotipos de caprinos do Brasil vem se tornando cada vez mais importante, pois estes animais fazem parte da história cultural do sertanejo, sendo uma importante fonte de renda e alimento para estas populações.

Muitas pesquisas relatam que as populações de animais locais com características importantes, tais como adaptação a ambientes de condições específicas devido ao longo processo de isolamento geográfico, seleção natural e artificial notadamente morfológica, adquiriram características que permitem a sobrevivência em ambientes com baixa quantidade e qualidade de alimentos, vêm sendo substituídas por raças exóticas causando uma rápida erosão genética dos recursos genéticos locais. Trabalhos como os de Mariante et. al. (1999); Oliveira et al. (2003); Ribeiro et al. (2004); Oliveira et al. (2005), também fazem referência a rusticidade destes animais.

A genética da conservação tornou-se uma atividade de extrema importância para a manutenção de populações ameaçadas, uma vez que consiste no manejo das pequenas populações para a manutenção da diversidade genética e minimizar o endocruzamento; delimitar unidades de manejo e resolver incertezas taxonômicas.

O tamanho efetivo populacional (N_e) é um dos pontos importantes em estudos de conservação, pois, segundo Wright (1931), o N_e determina a genética estocástica de uma população. No Brasil, pouco se conhece sobre o verdadeiro tamanho efetivo das populações locais. Destaca-se apenas o estudo de Lima et al. (2007) com raças locais de caprinos do Estado da Paraíba. Além dos poucos estudos sobre essas populações, o uso desordenado de acasalamentos entre as diversas raças de caprinos tem contribuído para perda de diversidade antes mesmo que seja avaliada, o que compromete a implementação de futuros programas de conservação (Oliveira et al., 2007). Muitos processos genéticos e suas consequências em uma população finita (ex. acasalamento, depressão endogâmica, deriva e baixa variação, acúmulo de mutações deletérias e declínio da adaptação) estão relacionados com o N_e (Wang, 2001), pois este, por determinar a taxa de crescimento da população é importante para o monitoramento da diversidade genética de populações (Launey et al., 2001).

Dentre as várias etapas de um programa de conservação, a caracterização genética permite avaliar o perfil genético da raça e/ou população, tornando-se pré-requisito essencial para o gerenciamento e a conservação destas (Bjornstad e Roed, 2002). A identificação de populações que sofreram severa redução no tamanho é de extrema importância para conservação devido à sua maior suscetibilidade à extinção (Cornuet e Luikart, 1996). Estudos sobre a caracterização genética de caprinos locais brasileiros e espanhóis foram realizados por Menezes et al. (2006), para a raça Moxotó por Oliveira (2007) com microssatélites e com isoenzimas para caprinos da raça Anglo-Nubiana e Moxotó por Rocha et al. (2007).

Encontram-se na literatura estudos que procuram identificar a população de origem de um indivíduo, a partir de dados moleculares e com auxílio de diversos métodos estatísticos, como os de Pritchard et al. (2000), Baudouin et al. (2004), Rannala e Mountain (1997) e Paetkau et al. (1998), além do efeito conhecido como “gargalo genético” (*bottleneck*), que resulta da redução ocorrida no tamanho efetivo de uma população. Uma vez que o tamanho das populações naturais pode sofrer mudanças drásticas em seu processo evolutivo (Nei et al., 1975), e em uma população o tamanho constante da heterozigosidade esperada para um loco neutro quando mutação e deriva genética estão em equilíbrio é dado por $4Nv/(4Nv+1)$ sob a suposição de que as novas mutações são sempre diferentes dos alelos pré-existentes, onde N é o tamanho efetivo da população e v a taxa de mutação por locos por geração (Kimura, 1968).

O estudo do efeito de *bottleneck* e a sua detecção tornam-se importante na conservação, pelo fato deste aumentar os riscos da extinção da população, ao promover redução no número efetivo, além do número de alelos e redução dos locos polimórficos (Piry et al., 1999).

Nos últimos anos, a análise bayesiana vem sendo empregada no estudo genético de populações como complemento a outros métodos de análise. Apesar de ser um método relativamente antigo, só recentemente é que essa metodologia começou a ser empregada nas análises genéticas populacionais. Em caprinos destacam-se os trabalhos de Martínez et al. (2007) avaliando a estrutura populacional de várias raças, Oliveira et al. (2007) com caprinos locais da raça Moxotó e Fátima et al. (2008) estudando a diversidade e o efeito *bottleneck*. Em bovinos, destacam-se MacNeil et al. (2007) estudando as relações genéticas entre os bovinos do Alasca, Valiente (2007) caracterizando o bovino crioulo mexicano, em aves (Banhos et al., 2007), Barbosa et al. (2008) avaliando parâmetros genéticos em suínos e, Amirinia et al. (2007) estudando *bottleneck* e a estrutura genética em cavalos Caspian. A inferência

bayesiana também tem sido usada em outras áreas como medicina forense, na própria agronomia e economia.

Segundo Maudet (2001), a designação de determinado indivíduo à sua respectiva população ou a procedência de produtos de origem animal, através de métodos moleculares permite certificar a procedência de um animal, de uma carcaça, de embriões ou sêmen de uma raça, bem como identificar animais híbridos. Para isto torna-se cada vez mais importante avaliar a confiabilidade dos métodos disponíveis para esse fim. A avaliação e identificação de populações que sofreram redução no número são importantes, pois estão mais susceptíveis às ameaças e riscos de extinção (Cornuet e Luikart, 1996).

O estudo de populações colonizadoras, como é o caso dos caprinos brasileiros, e o efeito de “gargalo genético” sofrido torna-se importante, pois ajuda a compreender e avaliar as mudanças ocorridas desde a colonização até os dias atuais. Desta forma, a capacidade de gerar dados de DNA e da variedade de métodos analíticos para a genética de conservação vem se expandindo a um ritmo cada vez maior (Paerse et al., 2004) e, os microssatélites estão entre os marcadores largamente aplicado em estudos de diversidade (Maudet et al., 2002b).

Segundo Paulino et al. (2003), durante a primeira metade do século XX, a abordagem clássica foi adotada quase que de forma unânime pelos estatísticos. Com os avanços computacionais a abordagem bayesiana surge como uma alternativa que conduz a resultado mais preciso. Este método pode ser aplicado aos marcadores de vários tipos como o RFLP, microssatélites, assumindo que os marcadores devem estar em equilíbrio de ligação e Hardy-Weinberg dentro das populações. Cornuet et al. (1999) avaliando, através de genótipos multilocus, um novo método de designar indivíduos de origem desconhecida à população, verificou que o método bayesiano apresentou-se superior aos métodos que se baseiam nas distâncias, tendo conseguido 100% de designações corretas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade e estrutura genética de populações caprinas locais brasileiras e algumas raças exóticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas catorze populações caprinas, das quais seis consistiam de caprinos locais brasileiros (Azul, Canindé, Graúna, Marota, Moxotó e Repartida), quatro raças exóticas utilizadas atualmente no Brasil (Alpina, Anglo-Nubiana, Boer e Saanen) e três populações de caprinos espanhóis (Murciano, Murciano-Granadina e Granadina (Associação de Criadores Espanhóis de Murciano-Granadina), sendo a Murciano-Granadina, mestiça. Além dessas, utilizou-se uma população de caprinos sem padrão racial definido (SRD), que é uma população mestiça resultante do acasalamento desordenado entre indivíduos de diferentes raças caprinas existentes na região Nordeste do Brasil. Na tabela 1 encontram-se as populações estudadas e seus respectivos locais de origem, onde foram recolhidas a descrição das amostras e locais de coleta. Foram coletados bulbos capilares de cada animal, os quais foram armazenados em envelopes identificados e congelados até a extração do DNA.

Tabela 1. Populações estudadas, número de animais (N), origem do material coletado e siglas

Populações	N	Origem	Siglas
Sem Padrão Racial	40	Ibimirim-Pernambuco/Nordeste-Brasil	SRD
Alpina	40	Nordeste-Brasil	ALP
Boer	40	Nordeste-Brasil	BOER
Anglo-Nubiano	26	Nordeste - Brasil	ANG
Saanen	36	Brasil/Espanha	SAAN
Azul	40	Paraíba/Nordeste-Brasil	AZUL
Moxotó	40	Ibimirim e Serra Talhada/ Pernambuco/Nordeste-Brasil	MOX
Marota	40	Embrapa - Piauí/Nordeste-Brasil	MAR
Canindé	40	Paraíba/Nordeste-Brasil	CAN
Repartida	40	Bahia/Nordeste-Brasil	REPAR
Graúna	39	Pernambuco/Nordeste-Brasil	GRAU
Murciana	35	Espanha	MUR
Murciano-Granadina	20	Espanha	MG
Granadina	35	Espanha	GRAN

Foram utilizados 23 microssatélites TGLA122 (George et al., 1992); BM1329, BM6506, BM6526, BM8125 (Bishop et al., 1994); CSSM66, ETH225 (Barendse et al., 1994); CSRM60, SPS115 (Moore et al., 1993), MM12 (Mommens et al., 1994); ILSTS011, MAF209, MAF65, SRCRSP8 (Luikart et al., 1999); HSC, McM527 (Isag, 2002); BM1818 (Li et al., 2002); CSRD247 (FAO, 2004); OarFCB11, OarFCB48, OarFCB304 (Yang et al., 1999); ETH10 (Solinas-Toldo et al., 1993); INRA63 (Vaiman et al., 1994), para a realização das análises. Amplificados pelo método da PCR, segundo protocolo da Martínez et al. (2004). As informações foram recolhidas e analisadas através do programa Genescan

Analysis®, versão 3.12, e Genotyper v. 3.7 para análise das bandas e identificação dos alelos de cada microssatélite

2.1. Análise estatística

Para cada população e microssatélite foram calculados a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e, o número de alelos que foi calculado apenas para os microssatélites, considerando as populações como uma só.

Foram calculados os três parâmetros da estatística F de Wright (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) ou descritos por Weir e Cockerhan (1984) (f , F e θ), que pode indicar o excesso ou déficit de heterozigoto. Estes parâmetros indicam a correlação de alelos dentro dos indivíduos de uma mesma população (F_{IS} ou f); do indivíduo com o total da população, sem considerar subdivisão na população (F_{IT} ou endogamia total), que é devido tanto à endogamia dentro das populações como à diferenciação entre elas; e a coancestralidade (θ ou F_{ST}), que é a correlação de genes de um indivíduo vindo de diferentes subpopulações. Com o estatístico F é possível conhecer a estrutura populacional nas situações onde há ou não seleção, e esses podem ser calculado pela heterozigosidade observada e esperada, que representa o índice de diversidade genética proposto por Nei (1977), como:

$$F_{IS} = 1 - \frac{\bar{H}}{\bar{H}_{e_s}} \quad F_{IT} = 1 - \frac{\bar{H}}{\bar{H}_{e_t}} \quad F_{ST} = 1 - \frac{\bar{H}_{e_s}}{\bar{H}_{e_t}}$$

Onde \bar{H} é a frequência de heterozigoto observada e \bar{H}_{e_s} e \bar{H}_{e_t} são as heterozigosidade esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou a medida da diversidade genética nas subpopulações e população total, respectivamente. Todas as análises acima foram realizadas pelo programa Genetix v.4.04.02 (Belkhir et al., 2003).

Para verificar a estrutura genética das populações foram utilizados o F_{ST} de linearidade, análogo ao índice R_{ST} (Slatkin,1995), que considera um modelo demográfico simples, de distância genética de população par a par, considerado um método de distância inter-populacional, e a análise molecular de variância (AMOVA), que é um método de nível inter-populacional, similar a outros métodos de aproximação baseados em análise de variância de frequências gênicas. Ambas as análises foram executadas com o auxílio do software Alerquin v. 3.01 (Excoffier et al., 2006), no qual foi definido três grupos populacionais (exóticas, locais e espanholas) a partir de quatorze populações caprinas.

Utilizou-se o programa *Bottleneck* v.1.2.0 (Piry et al., 1999), apenas nas populações de caprinos locais brasileiros, para testar se as populações se encontram em equilíbrio entre mutação e deriva genética, conforme metodologia descrita em Cornuet e Luikart (1996), verificando se houve redução no tamanho populacional, com simulação de 10.000 replicações. Este programa permite avaliar se populações passaram por recente redução no tamanho efetivo populacional ou efeito genético de “gargalo de garrafa”, podendo exibir diminuição no número de alelos e também da diversidade gênica (H_e , ou heterozigosidade esperada pelas proporções de EHW) nos locos polimórficos. A recente redução é definida como aproximadamente $2N_e - 4N_e$ gerações passadas e depende de alguns fatores, tais como a severidade do *bottleneck*, o modelo mutacional e a taxa de mutação dos locos estudados (Cornuet e Luikart, 1996). No entanto, o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade (H_e), o que faz com que H_e se torne maior do que a heterozigosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva (H_{eq}), já que H_{eq} é calculada a partir do número de alelos e do tamanho amostral (Cornuet e Luikart 1996, Piry et al., 1999).

O programa *bottleneck* dispõe de três modelos mutacionais, o IAM (Modelo de Alelos Infinitos), o SMM (Modelo de Mutação Gradual ou Stepwise) e o TPM (Modelo de duas fases). O primeiro modelo, descrito por Kimura e Crow (1964), descreve que cada mutação cria um novo alelo, sem considerar o alelo que lhe deu origem, podem estes ser perdidos por deriva até alcançar o equilíbrio. A rigor, o excesso de heterozigosidade (ou *déficit*) tem sido demonstrado apenas para locos que envolvem esse modelo. Caso o loco evolua de forma gradual, o modelo SMM (Ohta e Kimura, 1973) ou mutação escalonada, pode ser utilizado para descrever a mutação dos alelos de microssatélites pela perda ou ganho de uma unidade de repetição da série e que pode mutar ou converter-se em um alelo já existente na população. Entretanto, para a maioria dos microssatélites, o modelo TPM, segundo Di Rienzo et al. (1994) seria o mais apropriado a ser utilizado, pois incorpora o modelo SMM, e tem capacidade de captar melhor a variação promovida pela mutação, assumindo que certa fração das mutações ocorre através de múltiplas unidades de repetição. Com este modelo foram realizados três testes, o teste do sinal (T_1), teste de diferenciação padronizada (T_2) e o teste Wilcoxon (T_3). O primeiro teste serve para comparar estatisticamente o número de locos esperados com excesso de heterozigosidade com a heterozigosidade observada, não levando em consideração o excesso ou déficit de heterozigosidade; o segundo teste é utilizado quando se analisa mais de 20 locos (Cornuet e Luikart, 1996; Luikart e Cornuet, 1998) e o terceiro teste contrasta a hipótese nula de equilíbrio contra as hipóteses alternativas de excesso e

deficiência de heterozigosidade, sendo considerado mais poderoso e robusto, quando comparado aos demais testes, além de ser utilizado com poucos locos polimórficos (<20) (Piry et al., 1999).

2.1.1. Método de agrupamento e análise da estrutura populacional

A estrutura genética da população foi avaliada também pelo programa Structure v.2. (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003), com um aquecimento inicial de 500.000 *burn-in* e 10^6 interações, assumindo $k=2$ a $k=14$, com cada valor de k repetidos duas vezes. Este pacote estatístico baseia-se na inferência bayesiana e no desaparecimento da influência de alelos raros, com base em um modelo *a priori* de estruturação genética e um modelo *a priori* não definido. O programa permite a determinação do coeficiente de ancestralidade (Q) e divergência genética (F_{ST}) através do método MCMC (Pritchard et al., 2000). O método baseia-se em modelos de estruturação que permite a comparação entre uma estrutura populacional determinada *a priori* pelo usuário com base em dados previamente disponíveis (ex. análise de agrupamento) com modelos de estruturação que incluem um número não definido de subpopulações.

Os estados extremos dessas populações são chamados de estados de absorção, os quais ocorrem quando um alelo foi perdido (frequência 0) ou fixado (frequência 1). A probabilidade de uma população passar de um estado a outro é chamada de probabilidade de transição, que pode ser arranjada em uma matriz, na qual esse modelo, expresso em termos de estados descontínuos com probabilidades fixas de passagem de um estado a outro, é conhecido por cadeia de Markov (Fernandez-Matioli, 2001).

Os modelos assumem o EHW e o de ligação entre os *locos* dentro das populações. Sob essa suposição, cada alelo de cada loco, em cada genótipo, é um esboço independente da distribuição de frequências, especificando a probabilidade de distribuição $Pr(X/Z,P)$ (Pritchard et al., 2000). Os mesmos autores relatam que o método Bayesiano promove uma coerente estrutura para incorporar as incertezas inerentes aos parâmetros estimados dentro da inferência produzida e, para avaliar o poder de evidência para os *clusters* estimados facilitando a incorporação de informações sobre a localização geográfica dos indivíduos, quando disponíveis.

Observando os genótipos, X, e que P e Z foram dados por uma distribuição posterior, tem-se:

$$Pr(Z, P/X) \propto Pr(Z) Pr(P) \cdot Pr(X/Z,P)$$

Para se calcular essa distribuição, são necessários pacotes computacionais, com os quais é possível obter uma aproximação de $(Z^{(1)}, P^{(1)}) \dots (Z^{(m)}, P^{(m)})$ de $\Pr(Z, P/X)$, usando-se o método da MCMC (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003).

O programa *Structure* dispõe de quatro modelos ancestrais. Neste trabalho foi utilizado o modelo *com misturas (admixture model)* associado ao modelo de correlação das frequências alélicas (Falush et al., 2003), com algoritmo de distribuição de Dirichlet (algoritmo de análise multivariada). Neste modelo, $\Pr(Z, P, Q/X)$ é a probabilidade *a posteriori*, sendo X os genótipos das amostras, P denota as frequências alélicas (desconhecidas) em todas as populações, Z a população (desconhecida) de origem do indivíduo que, com a introdução do vetor Q dado por $q_k^{(i)}$ (denota a proporção de mistura para cada indivíduos, e $q_k^{(i)}$ é a proporção de i genoma de indivíduos originado *por* k populações), é modificado para $z_l^{(i,a)}$ população de origem de cópias alélicas $x_l^{(i,a)}$ (Pritchard et al., 2000). Para a construção dos *clusters* (figuras) da estrutura populacional foi utilizado o programa Distruct (Rosenberg, 2003).

3. RESULTADOS

3.1. Número de alelos, Heterozigosidade Observada, Esperada e estatística F

O número de alelos e a heterozigosidade observada encontram-se na Tabela 2. Observa-se nesta tabela que todos os marcadores microssatélites apresentaram alto polimorfismo, com diferentes números de alelos, sendo os microssatélites MAF209 e ETH225 menos polimórficos (03 e 04 alelos) por locos. Os níveis de heterozigosidade variaram de baixo a moderados em quase todas as populações analisadas. Observa-se que o microssatélite MAF209 apresentou variação de 0 (populações Azul e Moxotó) a 0,12 (Repartida), para os caprinos locais, exceto em uma população de caprinos exóticos (Boer), que apresentou níveis de H_O médio (0,61). Os microssatélites SPS115 e ETH225 também apresentaram baixos níveis de H_O , variando de 0,137 a 0,580. Ainda na tabela 2 encontram-se os desvios para o EHW, onde as populações SRD, Alpina, Moxotó e Murciano-Granadina apresentaram maiores proporções de marcadores em desequilíbrio (7, 7, 8, 8).

O marcador CSSM66 apresentou desequilíbrio em 8 populações, apesar de ter apresentado maior número de alelos (29). Por apresentar tantos alelos, as combinações genóticas são muitas e isto influencia nos resultados, pois é praticamente impossível que as combinações teóricas se aproximem das que realmente estão apresentadas nas populações estudadas, levando a maiores proporções de desequilíbrio.

Na Tabela 3 observa-se o número médio de alelos nas populações, variando de 5,08 (Boer) a 7,30 (Alpina e Granadina), em menor variação nas populações locais brasileiras (5,7 a 6,7), como era de se esperar. Os maiores valores para H_O e H_e foram obtidos nas populações Anglo-Nubiana e Alpina (0,69-0,66) e Alpina e SRD (0,710). Os rebanhos locais apresentaram moderada diversidade genética (0,50 – 0,66), fator decisivo para o sucesso de programas de conservação e melhoramento, quando utilizado adequadamente.

Com base nos valores de F_{IS} percebe-se que dentre as populações de caprinos locais brasileiros, apenas a raça Moxotó apresentou valores acima de 0,10 (Tabela 3), indicativo de excesso de homozigotos. Em relação às exóticas, a raça Anglo-Nubiana apresentou F_{IS} negativo, indicativo de excesso de heterozigotos.

Através da G_{ST} e dos estatísticos F , encontrados na tabela 4, pode-se obter a diversidade genética e a consanguinidade de cada marcador, podendo-se avaliar o comportamento destes na população global. Os valores de G_{ST} apresentam-se similares aos de

F_{ST} , este último indica o nível de diferenciação média entre as populações. Esta similaridade se deve a que o F_{ST} equivale ao G_{ST} .

O G_{st} oscilou entre 0,068 (INRA63) e MAF209 (0,284), com valor médio de 0,13 ou 13%. O valor médio de F_{ST} (θ), que indica o nível de diferenciação genética média devido à subdivisão da população, foi de aproximadamente 12% e os valores médios entre os marcadores variou de 5% (INRA63) a 32% (MAF209). Os valores de F_{ST} geralmente são inversamente relacionados à habilidade de dispersão e, quando os valores deste parâmetro são altos, as populações tendem a divergir e tornar-se endogâmias. Já o parâmetro F_{IT} variou de 0,38241 (MAF209) a 0,070 (CSRM60). Os F_{IS} (f) que indica a média de F_{IT} obtido a partir do coeficiente de consanguinidade de cada uma das subpopulações em que se divide a população, variaram de -0,02 (CSRM60) a 0,254 (CSSM66), cujos valores negativos são indicativos de excesso de heterozigoto para alguns marcadores (Tabela 4).

Tabela 2. Número de alelos por locos (Na), Heterozigosidade Observada (H_o) por locos nas populações

Locos	Na	H _o													
		SRD	ALP	BOER	ANG	SAAN	AZUL	MOX	MARO	CANIN	REPAR	GRAU	MUR	MG	GRAN
BM1329	12	0,681	0,766*	0,530	0,610	0,639	0,748	0,632	0,688	0,787	0,624	0,805	0,764	0,759	0,737
BM6506	10	0,721	0,809	0,540	0,549	0,803	0,121	0,232	0,537	0,491	0,568	0,380	0,788	0,830	0,701
BM8125	08	0,730	0,775	0,540	0,623	0,757	0,775	0,711	0,714	0,742	0,670	0,752	0,698	0,815	0,783
BM1818	10	0,769*	0,794	0,314	0,476	0,736*	0,688	0,782	0,496	0,807	0,796	0,703	0,793	0,837*	0,794
CSR247	10	0,799	0,600	0,565	0,810	0,731	0,567*	0,752	0,681	0,774	0,779	0,519	0,757*	0,743	0,597
HSC	17	0,857*	0,800*	0,782	0,786*	0,833	0,745*	0,684*	0,823	0,731	0,807	0,777	0,864	0,814	0,858
MM12	16	0,833	0,877	0,778	0,588	0,884	0,663	0,807*	0,663	0,724	0,830	0,727	0,621	0,771	0,888
OarFCB48	09	0,758	0,805*	0,548	0,676	0,794	0,495	0,582	0,653*	0,599	0,601	0,550	0,850	0,821	0,830
SRCRSP8	12	0,814	0,749*	0,706	0,739*	0,665	0,671	0,736*	0,722	0,729	0,808	0,709*	0,694	0,756	0,718
INRA63	06	0,551	0,635	0,725	0,678	0,626*	0,565	0,555	0,544	0,552*	0,469	0,651	0,728*	0,734*	0,645
MAF209	03	0,167	0,073	0,611*	0,381	0,081	0	0	0,025	0,074	0,120*	0,025	0,268	0,261*	0,084
ILSTS011	09	0,713*	0,824	0,693	0,564	0,779*	0,561	0,701*	0,507	0,644*	0,757	0,550	0,673	0,614	0,766
SPS115	06	0,603*	0,572	0,459	0,495	0,286	0,406	0,398*	0,505	0,540	0,550*	0,483	0,364*	0,367	0,352
TGLA122	12	0,864*	0,814	0,572	0,672	0,769	0,676	0,815	0,822	0,792	0,8	0,764	0,646	0,724	0,648
BM6526	17	0,767	0,835	0,809	0,751	0,830	0,686*	0,667	0,813	0,601	0,707	0,772	0,508	0,670*	0,807
CSRM60	10	0,757	0,844	0,666	0,782	0,767	0,712	0,749	0,770*	0,713*	0,713	0,781	0,799	0,819	0,836*
CSSM66	29	0,823*	0,906*	0,719*	0,824	0,882*	0,654	0,647	0,811	0,729	0,856	0,751*	0,867*	0,824*	0,834*
McM527	09	0,772	0,812	0,647	0,700	0,426	0,552	0,710*	0,551	0,680	0,714*	0,688	0,631	0,657	0,703
OarFCB11	15	0,790	0,724*	0,792*	0,610	0,705	0,594	0,739*	0,446	0,804	0,567	0,659	0,797	0,712	0,800
OarFCB304	18	0,842	0,827	0,542*	0,611	0,779*	0,846	0,688	0,619*	0,792*	0,756	0,845	0,819	0,709*	0,802
MAF65	10	0,830*	0,798*	0,618	0,723	0,738	0,692*	0,669*	0,559*	0,759*	0,733	0,717*	0,807	0,887*	0,815
ETH225	04	0,221	0,361	0,542	0,460	0,137	0,530	0,483	0,460	0,366	0,444*	0,581	0,339	0,229	0,189
ETH10	06	0,657	0,647	0,645	0,510	0,672	0,296	0,585	0,576	0,616	0,580*	0,618	0,493	0,548*	0,593

SRD, Sem padrão racial definido; ALP, Alpina; Boer, Boer; ANG, Anglo-Nubiana; SAAN, Saanen; AZUL, Azul; MOX, Moxotó; MAR, Marota; CAN, Canindé; REP, Repartida; GRAU, Graúna; MUR, Murciano; MG, Murciano-Granadina; GRAN, Granadina.

* Marcadores em desequilíbrio para o EHW (P<0,05)

Tabela 3. Número de amostras (N), número médio de alelos (Na), heterozigosidade média observada (Ho), heterozigosidade média esperada (He) e índice de fixação dentro da população (F_{IS}) dos 14 rebanhos caprinos

Pop	N	Na	Ho	He	F_{IS}
<i>SRD</i>	40	6,95	0,635	0,710	0,106
<i>ALP</i>	40	7,30	0,661	0,724	0,088
<i>BOER</i>	40	5,08	0,593	0,624	0,049
<i>ANG</i>	26	5,22	0,693	0,636	-0,092
<i>SAAN</i>	36	7,17	0,630	0,666	0,055
<i>AZUL</i>	40	5,91	0,541	0,576	0,061
<i>MOX</i>	40	5,82	0,540	0,623	0,134
<i>MARO</i>	40	5,69	0,573	0,608	0,058
<i>CANIN</i>	40	5,95	0,606	0,654	0,074
<i>REPAR</i>	40	6,69	0,615	0,663	0,073
<i>GRAU</i>	39	6,73	0,619	0,644	0,038
<i>MUR</i>	35	6,82	0,609	0,677	0,101
<i>MG</i>	20	6,40	0,631	0,691	0,088
<i>GRAN</i>	35	7,30	0,646	0,686	0,059
<i>média</i>		103,03	0,632	0,656	

Tabela 4. Coeficiente de diversidade genética (G_{ST}) e estatística F (F_{ST} , F_{IT} e F_{IS})

Locos	G_{ST}	F_{ST}	F_{IT}	F_{IS}
<i>BM1329</i>	0,108	0,092	0,142	0,055
<i>BM6506</i>	0,235	0,244	0,268	0,031
<i>BM8125</i>	0,116	0,111	0,104	-0,007
<i>BM1818</i>	0,117	0,111	0,167	0,062
<i>CSRD247</i>	0,168	0,171	0,166	-0,005
<i>HSC</i>	0,088	0,079	0,114	0,038
<i>MM12</i>	0,099	0,086	0,076	-0,011
<i>OarFCB48</i>	0,127	0,119	0,133	0,015
<i>SRCSP8</i>	0,131	0,127	0,217	0,103*
<i>INRA63</i>	0,068	0,052	0,197	0,153*
<i>MAF209</i>	0,284	0,320	0,382	0,091
<i>ILSTS11</i>	0,173	0,174	0,242	0,083
<i>SPS115</i>	0,154	0,146	0,289	0,167*
<i>TGLA122</i>	0,122	0,114	0,171	0,065
<i>BM6526</i>	0,153	0,146	0,149	0,002
<i>CSRM60</i>	0,097	0,094	0,070	-0,026
<i>CSSM66</i>	0,139	0,131	0,353	0,255*
<i>McM527</i>	0,146	0,142	0,163	0,024
<i>OarFCB11</i>	0,162	0,159	0,166	0,008
<i>OarFCB304</i>	0,138	0,127	0,208	0,092
<i>MAF65</i>	0,082	0,073	0,261	0,202*
<i>ETH225</i>	0,112	0,106	0,207	0,112*
<i>ETH10</i>	0,148	0,139	0,209	0,081
Intervalo de Confiança (95%)		0,111-0,145	0,157-0,218	0,03-0,100

* considera-se os valores superiores a 0,10

3.2. Diferenciação genética entre as populações

Na Tabela 5 encontra-se um resumo da análise de variância molecular (AMOVA), que evidencia maior variação entre indivíduos (79,92%), indicando que maior parte das diferenças decorre das diferenças entre indivíduos do que entre populações (8,64%). Assim, 87,30% da variação total foi atribuída à diferenciação dentro das populações, em que a variação restante (12,70%) foi diferente de zero ($F_{ST}=0,126$; $p<0,05$), o que gerou diferenças entre as populações.

Tabela 5. AMOVA para as 14 populações caprinas estudadas

<i>Fonte de variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Componente de variação</i>	<i>Porcentagem de variação</i>
Entre grupos	2	421,151	0,51434	6,58
Entre populações dentro dos grupos	11	620,754	0,67452	8,64
Entre indivíduos dentro das populações	497	3480,109	0,37979	4,86
Dentre indivíduos	511	3190,000	6,24266	79,92
Total	1021	7712,015	7,81130	

O F_{ST} calculado com base nos 23 marcadores nas 14 populações foi alto (0,127). As distâncias pareadas (F_{ST}) para os dados microssatélites (Tabela 6) foram significativas. Para as populações locais brasileiras. As menores distâncias foram observadas entre Graúna e Azul, seguida das populações de Moxotó e Canindé, Repartida e Canindé e Moxotó e Repartida, conforme Tabela 6 e, o mesmo foi observado entre SRD e Alpina. As menores distâncias foram observadas entre as populações espanholas (Granadina, Murciano-Granadina e Murciana), indicando fraca estruturação. Porém observou-se distâncias consideráveis entre as raças brasileiras e espanholas como esperado. Este fator pode ter sido devido ao isolamento geográfico ou devido a possíveis efeitos de deriva ou amostragem. Já o rebanho SRD apresentou-se próximo das populações locais do Brasil, indicativo da presença ainda marcante dos caprinos locais nos sistemas de produção vigentes.

Tabela 6. Distâncias pareadas (F_{ST}) entre as 14 populações caprinas estabelecidas. ¹

	SRD	ALP	BOER	ANG	SAAN	AZUL	MOX	MARO	CANIN	REPAR	GRAU	MUR	MG	GRAN
SRD	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ALP	0,058	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
BOER	0,143	0,164	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ANG	0,089	0,128	0,191	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
SAAN	0,091	0,057	0,203	0,157	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AZUL	0,124	0,145	0,268	0,235	0,196	-	*	*	*	*	-	*	*	*
MOX	0,084	0,119	0,231	0,202	0,160	0,088	-	*	-	*	*	*	*	*
MARO	0,085	0,103	0,208	0,183	0,170	0,092	0,076	-	*	*	*	*	*	*
CANIN	0,069	0,098	0,202	0,177	0,136	0,111	0,049	0,108	-	-	*	*	*	*
REPAR	0,067	0,095	0,210	0,156	0,121	0,108	0,052	0,088	0,048	-	*	*	*	*
GRAU	0,083	0,097	0,229	0,182	0,145	0,035	0,077	0,070	0,097	0,090	-	*	*	*
MUR	0,103	0,070	0,189	0,152	0,082	0,218	0,202	0,176	0,160	0,166	0,170	-	-	-
MG	0,083	0,064	0,175	0,139	0,055	0,213	0,184	0,166	0,149	0,137	0,157	0,010	-	-
GRAN	0,083	0,062	0,171	0,132	0,070	0,213	0,184	0,163	0,149	0,146	0,155	0,036	0,023	-

* $p < 0,05$

¹Métodos das distâncias (F_{ST})

3.3. Efeito de “gargalo genético” (*Bottleneck*) nas populações caprinas locais

O resultado das análises que testam recentes reduções no tamanho efetivo populacional (*bottleneck*) encontra-se na Tabela 7. As populações exóticas não foram consideradas neste estudo por serem consideradas populações “abertas”, rebanhos comerciais. Aplicaram-se três testes para o excesso de heterozigotos, os quais permitem determinar se uma população exibe número significativo de locos com excesso de heterozigosidade. Para as populações locais, o teste foi significativo para T₃ (Moxotó) e a para T₁ e T₂ (Graúna), rejeitando-se também a hipótese de nulidade. Estes resultados indicam a probabilidade de ter ocorrido um estrangulamento demográfico. Nas demais populações não foi observado efeito *bottleneck*.

Tabela 7. Análise do efeito *Bottleneck* (“gargalo genético”) para as populações caprinas locais usando o modelo TPM

<i>População</i>	<i>TPM</i>		
	<i>Teste do Sinal (T₁)</i>	<i>Teste diferenças padronizadas (T₂)</i>	<i>Teste de Wilcoxon (T₃)</i>
AZUL	-	*	-
MOX	-	—	*
MARO	-	-	-
CAN	-	-	-
REP	-	-	-
GRAU	*	*	-

* *Rejeita-se a hipótese nula (há bottleneck)*

- *Populações que não apresentaram bottleneck para os testes aplicados*

Embora a variabilidade genética de uma população seja geralmente medida em termos de heterozigosidade média, é importante conhecer o número de alelos por loco, pois caso esse número seja reduzido drasticamente após uma população passar por um “gargalo genético”, a adaptabilidade desta população pode ser limitada, mesmo que a heterozigosidade média continue elevada (Nei et al., 1975).

3.4. Estrutura populacional

A metodologia MCMC, desenvolvida com um modelo *a priori* indicou através da máxima verossimilhança uma distribuição *a posteriori* $\ln P(K/X) = -32314,0$ como K entre 12 e 13) de cada coeficiente de mistura de cada indivíduo, determinando-se o número real de populações (Figura 1).

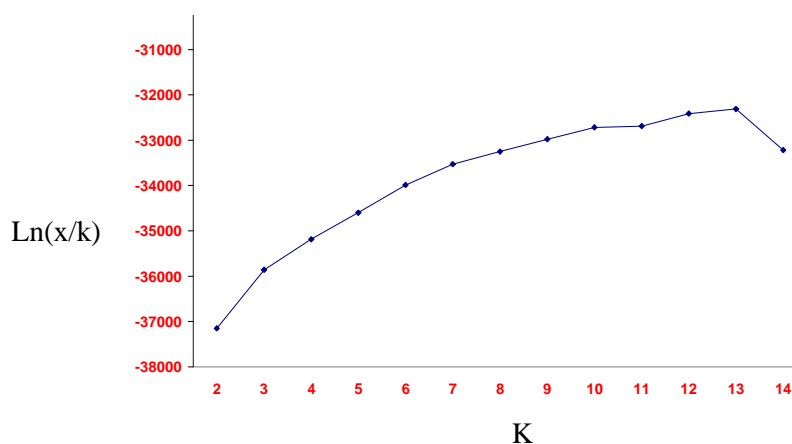


Figura 1. Representação gráfica da máxima verossimilhança e sua relação com os valores de k

A Tabela 8 foi construída para $K=13$ indicando as proporções das 14 populações amostradas, onde cada população é designada a um ou mais *clusters*. As populações exóticas (Alpina, Anglo-Nubiana e Boer) apresentaram alto nível de agrupamento (77%, 93,3% e 95,7%) em distintos *clusters*, com poucos indivíduos identificados como mistura ancestral. A raça Boer foi a que apresentou praticamente todos os indivíduos de sua população agrupados em um mesmo *cluster*. A raça Saanen foi designada a dois *clusters* (*cluster* 11 (40,4) e 13 (44,5)). Nas populações caprinas locais, os grupos Azul e Graúna agruparam-se para o mesmo *cluster* (*cluster* 2), com 75% e 58,1%, respectivamente. Fato semelhante é observado entre a população de Moxotó e Repartida (77,8% e 56,7%) no *cluster* 4, com proporção de indivíduos das demais populações caprinas locais agrupados para o mesmo *cluster* (2%-10%). É notório que a população Repartida apresenta maiores proporções de mistura com as populações Canindé e Moxotó, apresentando-se como um mestiço das duas raças. As populações Canindé e Marota apresentaram alta proporção de indivíduos designados (78% e 82%) para *clusters* diferentes (6 e 7). Na população SRD observa-se ligeira variação na proporção de indivíduos

designados em *clusters* diferentes (3,5%-64,3%), indicando maior agrupamento do SRD para o *cluster 12*, com alocação de alguns indivíduos em outros grupos, o que pode ser melhor visualizado na Figura 2.

Já para as populações espanholas, a Murciana e Murciana-Granadina foram agrupadas proporcionalmente em um mesmo *cluster*, com 22% de indivíduos da raça Granadina, sendo designados para o mesmo grupo (*Cluster 3*). Isto indica que a Murciano-Granadina possui maiores proporções de Murciana em sua constituição genética (Figura 2), o que pode ser observado no *cluster 8*, que é partilhado pelas duas raças.

Os treze *clusters* constituídos de indivíduos dos quatorze grupos tiveram proporções de designação diminuídas (0,4% - 7,3%), com poucos indivíduos identificados como ascendentes, exceto para os indivíduos da população Saanen (44,5%) (Figura2), que se agrupou nos *clusters 11* e *13*, fato que pode ser explicado por serem considerados rebanho constituídos por animais da Espanha e do Brasil.

Tabela 8. Designação das populações aos respectivos grupos para k=13, usando o programa STRUCTURE

<i>População</i>	<i>Cluster1</i>	<i>Cluster2</i>	<i>Cluster3</i>	<i>Cluster4</i>	<i>Cluster5</i>	<i>Cluster6</i>	<i>Cluster7</i>	<i>Cluster8</i>	<i>Cluster9</i>	<i>Cluster10</i>	<i>Cluster11</i>	<i>Cluster12</i>	<i>Cluster13</i>
SRD	0,018	0,030	0,017	0,035	0,105	0,024	0,022	0,012	0,006	0,068	0,007	0,643	0,012
ALP	0,008	0,014	0,010	0,015	0,082	0,014	0,016	0,010	0,770	0,006	0,007	0,027	0,022
BOER	0,957	0,003	0,003	0,003	0,004	0,003	0,004	0,004	0,003	0,005	0,003	0,004	0,004
ANG	0,015	0,003	0,003	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	0,007	0,933	0,005	0,008	0,005
SAAN	0,006	0,006	0,030	0,006	0,017	0,005	0,006	0,019	0,037	0,010	0,404	0,010	0,445
AZUL-PB	0,003	0,750	0,010	0,098	0,009	0,024	0,027	0,007	0,012	0,006	0,036	0,012	0,007
MOX-PE	0,003	0,025	0,007	0,778	0,018	0,058	0,057	0,005	0,006	0,008	0,007	0,011	0,017
MARO-PI	0,004	0,033	0,004	0,074	0,010	0,013	0,817	0,005	0,006	0,006	0,005	0,015	0,007
CANIN-Ba	0,008	0,023	0,007	0,067	0,014	0,778	0,038	0,008	0,006	0,008	0,010	0,018	0,016
REPAR-Ba	0,011	0,044	0,014	0,567	0,019	0,188	0,025	0,012	0,014	0,023	0,016	0,055	0,011
GRAU-PB	0,004	0,581	0,014	0,018	0,211	0,011	0,034	0,018	0,041	0,008	0,020	0,012	0,028
MUR-Es	0,006	0,005	0,860	0,008	0,016	0,006	0,008	0,020	0,018	0,007	0,007	0,011	0,029
MG-Es	0,015	0,007	0,685	0,009	0,032	0,005	0,011	0,150	0,018	0,006	0,014	0,031	0,018
GRAN-Es	0,014	0,006	0,217	0,006	0,016	0,007	0,009	0,598	0,018	0,010	0,014	0,013	0,073

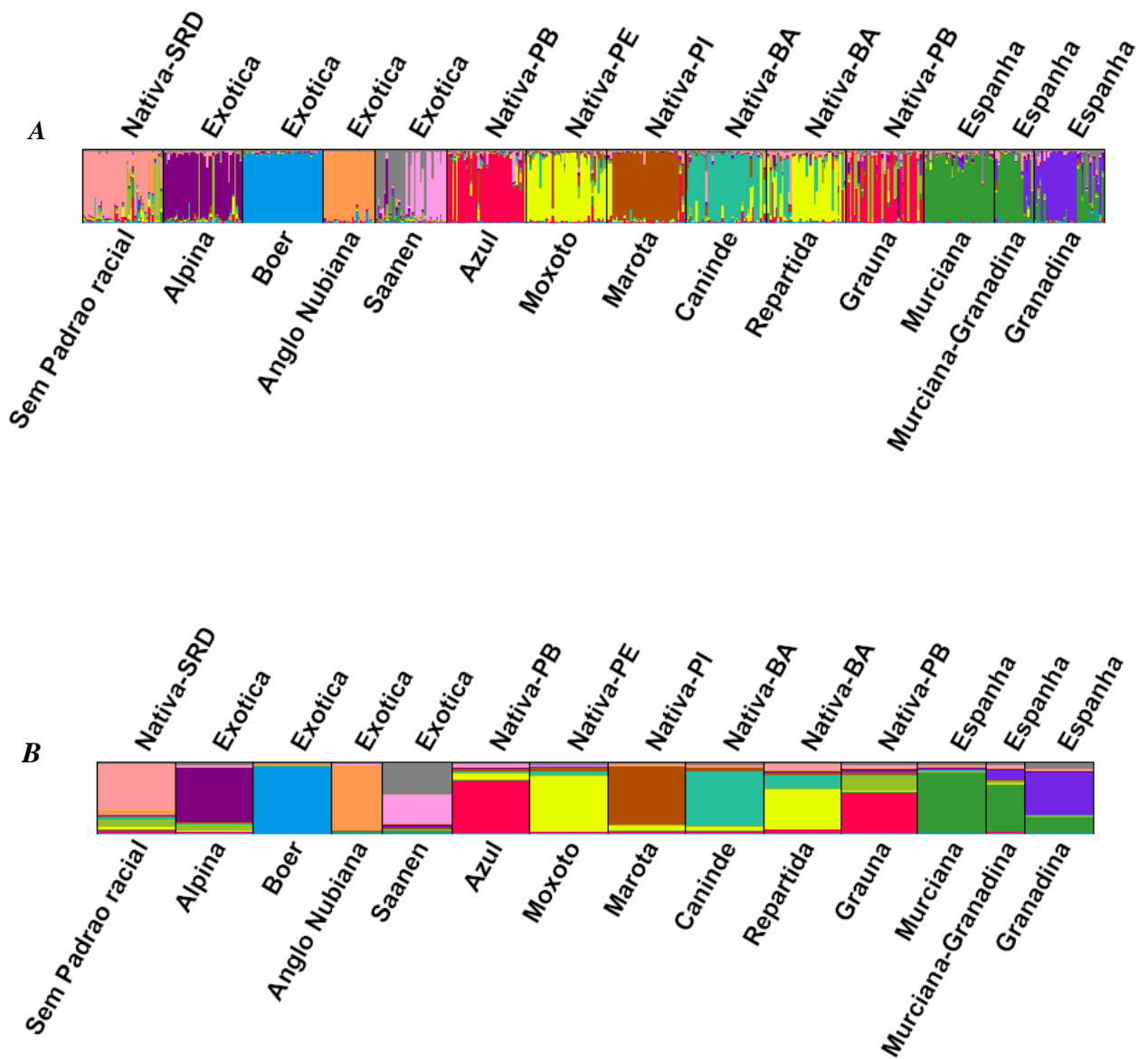


Figura 2. Designação de indivíduos (A) e de populações (B) usando a estrutura baseada na alocação das amostras para $K=13$. As cores correspondem a cada uma das 14 populações indicadas na Tabela 8. (A) Proporção de indivíduos designados à cada população, cada barra representa uma única amostra individual. (B) Alocação referente as populações caprinas

4. DISCUSSÃO

A maioria dos microssatélites estudados apresentou boas proporções de alelos para avaliação da diversidade genética, exceto os marcadores MAF209 e ETH225. Luikart et al. (1999) e Sechi et al. (2007) também encontraram proporções semelhantes para o MAF209, que é descrito na literatura como um marcador para ovinos, fato que pode ter influenciado este resultado, um vez que trata-se de espécies diferentes.

Já Fátima et al. (2008) ao avaliar a variabilidade genética de três rebanhos caprinos da Índia, utilizando dois sistemas multiplex com 18 microssatélites, verificaram que dois rebanhos (Gohilwadi e Zalawadi) apresentaram número de alelos (8) para o microssatélite ETH225, superiores aos relatados neste estudo. As proporções de alelos deste marcador observadas no presente estudo foram semelhantes às encontradas por Saitbekova et al. (1999). Estas variações são decorrentes das diferenças regiões de onde provém, da estrutura das amostragens e diferenças nas frequências alélicas.

Para o estudo da diversidade genética observou-se variação 0,57 (Azul) a 0,74 (Alpina), com média de 0,656 para o total de marcadores considerando a população total. Oliveira et al. (2007) obtiveram resultados entre 0,68-0,80 trabalhando com 410 caprinos de raças exóticas e locais, com resultados superiores aos encontrados neste trabalho. Joshi et al. (2004) obtiveram resultados de 0,90. No entanto, estes trabalharam com DNA mitocondrial em caprinos da Índia. Dentre os caprinos exóticos, o Boer foi o que apresentou a menor variabilidade genética (Tabela 3). Visser et al. (2004) observou baixa variação para esta raça, o que justifica-se por ser uma raça considerada das mais antigas, submetida à seleção artificial para várias características desde os últimos 50 anos. Assim, percebe-se que a manutenção da diversidade genética e equilíbrio nos acasalamentos torna-se importante para programas de conservação e melhoramento para que não ocorram perdas de alelos nas populações ameaçadas.

Quando os pressupostos que compõem a base do EHW são violados, ocorre então desvio do equilíbrio das frequências genotípicas. Os desvios observados em alguns marcadores nas populações podem ter sido causados por endogamia, pela não amplificação ou presença de alelos nulos, grupo de alelos defeituosos ou seleção contra o heterozigoto. Araújo et al. (2006) não encontraram desvios de equilíbrio para dois marcadores (INRA006 e ILST011) estudando populações Alpina, Saanen e Moxotó, que pode ser atribuído a efeito de amostragem. Estes têm sido reportados em vários trabalhos e indicam desvio dos

acasalamentos ao acaso (Luikart et al., 1999; Laval et al., 2000; Barker et al., 2001; Li et al., 2002).

As populações que apresentaram maiores quantidades de marcadores em desvios para o EHW também apresentaram valores de F_{IS} acima de 0,10 (Tabela 2 e 3). Este resultado indica que pode estar havendo seleção dirigida nestas populações. No caso da Alpina, rebanho melhorado para produção leiteira. No entanto, os rebanhos locais, como a Moxotó e Canindé não passaram por processos seletivos intensos e isso deve-se, provavelmente, ao isolamento geográfico e deriva, o que favorece à consanguinidade. Além disso, não existe gestão genética com vistas a manter o número efetivo ideal e controle dos acasalamentos para minimizar os efeitos da endogamia. Observa-se que a população Repartida é o grupo que possui maiores proporções de genes Moxotó e Canindé, como observado na Figura 2, demonstrando ter ocorrido um fluxo gênico destas populações naquela. Destaca-se que as populações Azul, Graúna e Marota, mesmo sendo considerados os grupos mais ameaçados devido ao menor efetivo, apresentaram menos de quatro marcadores em desequilíbrio.

As diferenças genéticas observadas entre as 14 populações (AMOVA, Tabela 8), validam os valores de distâncias do F_{ST} obtidos para todas as populações (Tabela 6). A diferença entre populações dentro de grupos (8,64%) foi mais elevada que a diferença entre os grupos (6,58%), indicando que as populações exóticas, local e espanhola são distintas. Oliveira et al. (2007) estudando três rebanhos de caprinos locais e exóticos encontraram maior variação entre indivíduos dentro das populações (88,51%) que entre populações (11,49%).

Esta estruturação pode ser observada na Figura 2, indicando que pode haver subdivisão de algumas populações, por consequência dos desvios das frequências genotípicas da população em relação ao EHW. Fan et al. (2008) e Qi et al. (2009) encontraram valores inferiores ao deste estudo ($G_{ST} = 5,7\%$ e $5,2\%$) para rebanhos de caprinos chineses, indicando que a diversidade total de caprinos resulta da diferenciação intra-racial. Os resultados encontrados são similares a outros que usam marcadores microssatélites e em grau de conclusão com os que utilizaram sequências de região controle de DNA mitocondrial (Luikart et al., 2001; Li et al., 2002; Fan et al., 2007).

Para Luikart et al. (2001) a estruturação populacional de caprinos (10%) é considerada fraca, quando comparados com os bovinos (84%) entre continentes e, um dos fatores que contribuem para essa situação se deve, provavelmente, da maior transposição intercontinental de caprinos. A maior proporção (79,92%) da variação genética total resulta das diferenças entre indivíduos, uma vez que estes pertencem a grupos e regiões demográficas

diferentes. Cañón et al. (2006) em trabalho realizado com caprinos da Europa e Oriente Médio, relatam que cerca de 41% da variabilidade genética entre as raças pode ser explicada pela origem geográfica dos indivíduos. Comentam ainda que uma característica típica da constituição genética de animais domésticos é a existência de rebanhos distintos geneticamente isolados e sujeitos a uma sistemática seleção de acordo com os objetivos da criação, o que não é uma característica das raças locais de caprinos do Brasil. Esse não foram submetidos a fortes pressões de seleção.

Os dados dos microssatélites sugerem que existe uma diferenciação genética entre os grupos caprinos (locais, exóticas e espanholas), (Tabela 6 a 8). Os elevados valores de distância (F_{ST}) se devem ao fato de não haver troca de material genético entre esses grupos, principalmente entre os grupos espanhóis e locais brasileiros e, destes com os exóticos, exceto com a população SRD, que apresentou proximidade com a raça Alpina e entre algumas populações caprinas locais e espanholas, com distância variando de 0,067 a 0,086 (Tabela 6), diferenças essas reveladas pelos resultados da AMOVA. A distância entre grupos locais e exóticos é uma constatação importante, pois permite concluir que esses grupos estão bem conservados e que as políticas de importação tem tido baixo impacto, pelo menos nos rebanhos estudados. Além disso, os rebanhos locais utilizados neste estudo provêm de criadores que não utilizam animais exóticos em seus rebanhos, o que não é uma generalidade. No entanto, as populações locais do Brasil estão muito próximas entre si, principalmente as Azul e Graúna; e Moxotó e Repartida e desta com o grupo Canindé. Isto denota a falta de um plano de manejo dessas populações de forma a evitar acasalamentos entre eles ou, talvez, a própria história de formação desses grupos e proximidade geográfica, que favorece os acasalamentos. Menezes (2005) usando a distância de Nei et al. (1983), encontraram distâncias maiores, certamente em função do uso de diferente metodologia.

Os resultados encontrados demonstram que alguns indivíduos da população SRD também apresentaram cruzamentos com outras raças, principalmente com as caprinas locais (Repartida, Graúna e Azul) e exóticas, (Tabela 8). Igarashi et al. (2000) e Oliveira et al. (2007) trabalhando com populações de caprinos Moxotó, Canindé, Graúna, Anglo-Nubiana, Alpina, Toggenburg, Saanen e SRD de diferentes estados do Brasil (Ceará, Minas Gerais, Paraíba e Rio Grande do Norte), com diferentes metodologias (marcadores protéicos e microssatélites), também encontraram semelhanças nas relações genéticas entre as populações SRD com os caprinos locais e os exóticos, fato que pode estar relacionado a cruzamentos

desordenados entre estas (SRD). Já para os rebanhos locais, indicaram um *status* de conservação, não apresentando em sua composição misturas.

Para o grupo exótico, observa-se grande proximidade entre as populações Alpina e Saanen (0,0570). Estes resultados corroboram a hipótese de origem comum destas raças (Suíça). Maudet (2001) estudando a diversidade genética de oito populações caprinas (Alpina francesa, Alpina suíça, Saanen francesa, Saanen suíça, Bionda, Girentana, Murciana e Toggenburg), também encontrou maior proximidade genética entre a Alpina francesa e Saanen suíça. As raças Boer e Anglo-Nubiana também apresentaram-se próximas (0,19) entre as exóticas, o que se deve ao fato da primeira ter sua origem na África do Sul a partir de animais trazidos da Índia e dos países árabes, e a última a pertencer a grupos do tronco asiático e africano. Nas populações espanholas estudadas, observam-se as menores distâncias e, Martínez et al. (2005) ressaltaram a que a raça Granadina vem sendo absorvida pela Murciana de forma gradativa e silenciosa.

A predefinição do número de *clusters* (k) estabilizou-se entre $k= 12-13$ (Fig. 1). Alguns indivíduos foram relacionados em múltiplos *clusters* (Tabela 8). Isto certamente deve-se ao fato de que a deriva genética ocorre rapidamente em pequenas populações isoladas, uma vez que esses grupos acumulam rapidamente diferentes frequências alélicas, como afirmam Rosenberg et al. (2002). Além disso, quando uma população é iniciada a partir de reduzido número de indivíduos (fundadores), a sua variabilidade dependerá da amostra de alelos trazida por esses fundadores e esse “efeito fundador” (*founder effect*) pode causar diferenças significativas entre frequências alélicas na população original e na população recém-formada (Nei et al., 1975; Robinson, 1998). Os mesmos autores relatam que a redução esporádica no tamanho de populações tem efeito sobre as gerações subsequentes. Assim sendo, o número mínimo de indivíduos que se reproduzem durante o período de estrangulamento demográfico (*bottleneck*) define a probabilidade de perda de alelos por deriva genética, e estes só poderiam ser recuperados por mutação ou a partir de outras populações, por migração.

Os gargalos genéticos e a intensidade com que ocorreram no passado e não documentados podem ser detectados através da perda da diversidade genética e, a partir dos microssatélites, pode-se identificá-los. O estudo de *bottleneck* é importante para a identificação de populações que passaram ou passam por esse estado, pois aquelas por uma recente redução do tamanho efetivo exibem redução do número de alelos e na diversidade genética de locos polimórficos (Luikart e Cornuet, 1998). Observa-se na Tabela 7 que o primeiro teste (T_1) indicou apenas duas populações (SRD e Graúna) com excesso de

heterozigoto. O baixo poder discriminatório deste teste pode ser devido ao fato deste requerer de 5 - 20 locos polimórficos e uma amostragem de aproximadamente 20-30 indivíduos (Luikart e Cornuet, 1998). Os mesmos autores ainda relatam que neste teste é detectado *bottleneck*, especialmente se este é grave.

Os testes T_2 (Teste diferença padrão) e T_3 (Teste Wilcoxon) foram os que apresentaram evidências de *bottleneck* na população SRD, apesar desta não ser considerada em perigo de extinção. As populações SRD e Alpina apresentaram considerável grau de consanguinidade ($F_{IS} > 0,10$). Os mesmos testes apresentaram evidências de *bottleneck* para três populações caprinas locais, Azul e Graúna (T_2) e Moxotó (T_3), as duas primeiras podem estar passando por um *bottleneck*, mesmo não indicando grau elevado de consanguinidade ($F_{IS} < 0,10$).

Amirinia et al. (2007) encontraram *bottleneck* para todos os testes nos três modelos (IAM, TPM e SMM) estudando cavalos. Já Fátima et al. (2008) encontrou evidências de *bottleneck* pelo teste Wilcoxon, apenas com o modelo IAM em caprinos Surti e, os autores relatam que esta população não se encontra em risco de extinção. O teste de diferença padronizada é indicado quando se utiliza mais de 20 locos polimórficos (aloenzimas ou microsatélites) (Cornuet e Luikart, 1996), para menos de 20 locos é recomendado o teste Wilcoxon, apesar de este teste ser análogos ao teste *sign* (Piry et al., 1999).

Para o agrupamento visualizado na Figura 2 (A e B), observa-se que alguns indivíduos das populações estudadas possuem relações parciais com outras populações (Figura 2, Tabela 8). A população Marota e Canindé apresentaram relativa homogeneidade, o que indica certo grau de pureza. A Graúna apesar de compartilhar o mesmo cluster com a Azul (figura 2, Tabela 8) foi a que apresentou maior proporção de indivíduos mestiços, quando comparada a outras populações caprinas locais. Já as populações Saanen, Murciano-Granadina e SRD, apresentaram subdivisão mais acentuada (*clusters* 12 e 13). Isto era esperado notadamente na Murciano-Granadina e SRD que são uma mistura de raças. Essa tendência de agrupamento também foi observada por Menezes (2005), tendo observado que as populações caprinas locais formaram subgrupos distintos: o primeiro formado pelas populações Moxotó, Canindé e Repartida, o segundo pela Azul e Graúna e o terceiro pela Marota, e que estas possuíam um elevado grau de pureza.

Apesar dos relatos de formação dos rebanhos locais brasileiros terem sido a partir de animais trazidos no período colonial, as populações espanholas e as exóticas inferidas neste estudo se apresentaram distantes dos grupos locais (Tabela 6, 8 e Figura 2).

Os resultados de Oliveira (2007) demonstraram que a relação genética entre a raça portuguesa Serpentina e a raça local Moxotó não apresentaram contribuições significativas para as populações caprinas locais. Nos estudos realizados nesse trabalho também não foram encontrados contribuições significativas de migrantes entre as populações caprinas locais e espanholas, bem como as exóticas. Os estudos genéticos associados aos relatos históricos indicam que as raças caprinas do Brasil são adaptadas e distintas daquelas raças das quais derivaram, por isso são considerados locais (Torres, 1984; Ribeiro et al., 2004; Menezes et al., 2006).

Martínez et al. (2007), ao estudar as relações genéticas das raças de caprinos Ibéricos e Latino Americanas, relataram que as cabras locais brasileiras se diferenciavam de todas as demais raças analisadas e que o possível motivo desta diferenciação poderia ser a migração, de outras populações que não foram relacionadas no estudo ou a deriva genética ou a seleção, que possam ocorrer nestas populações.

As implicações desse tipo de análise para estudos de conservação são muito importantes: se é uma raça e/ou espécie ameaçada que ocupa uma determinada área, então a estratégia de conservação deve ser no sentido de preservar a diversidade da raça e/ou espécie naquela área, pois já podem existir adaptações locais que se perderiam no caso de a população ser misturada com outra (Solé-Cava, 2001). Os efeitos de estocasticidade nas pequenas populações que incluem o endocruzamento, a perda da diversidade genética e o acúmulo de mutações (Frankham et al., 2008) devem ser estudados e analisados minuciosamente nas populações ameaçadas, uma vez que estas encontram-se em número reduzido, situação na qual se encontra a maioria das populações de caprinos locais do nordeste brasileiro.

5. CONCLUSÃO

Existe ainda suficiente variabilidade genética nos rebanhos estudados.

As populações estudadas formaram três grupos principais: caprinos locais brasileiros, exóticos e espanhóis.

Observou-se média estruturação nas raças exóticas;

Dentre as raças locais, apenas a Marota e Canindé apresentaram forte estruturação.

As populações Azul, Moxotó e Graúna apresentaram efeito de *gargalo genético*.

Os microssatélites (MAF209 e ETH225) propostos pela FAO e ISAG para estudo de diversidade genética em caprinos apresentaram-se pouco informativo neste estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amirinia, C.; Seyedabadi, H.; Banabazi, M.H.; Kamali, M.A. (2007). Bottleneck study and genetic structure of Iranian Caspian Horse population using microsatellites. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. v.10, n. 9, pp. 1540-1543.

Araújo, A.M.; Guimarães, S.E.F.; Machado, T. M. M.; Lopes, P.S.; Pereira, C.S.; Silva, F. L.R. Rodrigues, M.T.; Colombiano, V.S.; Fonseca, C.G. (2006). Genetics Diversity between herds of Alpine and Saanen dairy goats naturalized Brazilian Moxotó breed. *Genet. Mol. Biol.* v. 29, pp. 67-74.

Banhos, A.; Hrbek, T.; Sanaiotti, T.; Farias, I.P. (2007). Diversidade genética do Gavião-real (*Harpia harpyja*) na Amazônia Brasileira através de marcadores microssatélites. **53º Congresso Brasileiro de Genética** • 2 a 5 de setembro de 2007 Centro de Convenções • Hotel Monte Real Resort • Águas de Lindóia • SP • Brasil.

Barbosa, L.; Lopes, P. S.; Regazzi, A. J.; Torres, R. de A.; Junior, M. L. S.; Veroneze, R. (2008). Estimação de parâmetros genéticos em suínos usando Amostrador de Gibbs. *R. Bras. Zootec.* [online]. 2008. V. 37, n. 7, pp. 1200-1206.

Barendse, W.; Armitage, S.M. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*. v. 6, pp. 227-235.

Barker, J.S.F.; Tan, S.G.; Moore, S.S.; Mukherjee, T.K. Matheson, J-L.; Selvaraj, O. S. (2001). Genetic variation within and relationships among population of Asian goats (*Capra hircus*). *Jour. Animal Breed Genetics*. v. 118, pp. 213-233.

Baudouin, L.; Piry, S.; Cornuet, J. M. (2004). Analytical Bayesian Approach for Assigning Individuals to populations. *Journal of Heredity*. v. 95, n.3, pp. 217-224.

Bishop, M.D.; Kappes, S.M. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. v. 136, pp. 619-639.

Bjorstad, G.; Roed, K. (2002). Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Animal genetics*. v. 32, pp. 59-65.

Cañon, J.; García, D.; García-Atance, M. A.; Obexer-Ruff, G.; Lenstra, J. A.; Ajmone-Marsan, P.; Dunner, S. and The ECONOGENE Consortium. (2006). Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Animal Genetics*. *Animal Genetics*. v. 37, pp. 327–334.

Cornuet, J.; Luikart G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. v. 144, pp. 2001-2014.

Cornuet J, M.; Piry S.; Luikart G.; Estoup A.; Solignac M. (1999). New method employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*. v. 153, n. 4, pp. 1989-2000.

Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M. & Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. v. 91, pp. 3166-3170.

Falush, D.; Stephens, M. and Pritchard, J. K. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*. v. 164, pp. 1567–158.

Fan, B.; Han, J-L.; Chen, S-L; Mburu. D. N.; Hanotte, O.; Chen, Q-K.; Zhao, S-H.; Li, K. (2008). Individual-breed assignments in caprine populations using microsatellite DNA analysis. *Small Ruminant Research*. v. 75. pp. 154-161.

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

Fatima, S.; Bhong, C.D.; Rnk,D.N.; Joshi, C.G. (2008). Genetic variability and bottleneck studies in Zalawadi, Gohilwadi and Surti goat breeds of Gujarat (Índia) using microsatellites. *Small Ruminant Research*. v.77, pp. 58-64.

Fernandes-Matioli, F. M. de C. (2001). Genealogias e o processo de coalescência. In: Matioli. S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Ed. Holos. pp.162 – 171.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2008). **Fundamentos de Genética da Conservação**. Tradução: Sociedade Brasileira de genética. ED. SBG. 280p.

Georges, M.; Massey, J.M. (1992). Polimorphic DNA markers in Bovidae. Patent In: *WO Publication* (Ed by Org. WIP) Geneva.

Igarashi, M. L. S. P.; Machado,T.M.M; Ferro, J.A.; Contel, E.P.B. (2000). Structure and relationship among Brazilian naturalized and imported goat breeds. *Biochem. Genetic*. v. 38, pp. 353-365.

Joshi, M. B.; Rout, P. K.; Mandal, A. K. ; Tyler-Smith, C. ; Singh, L. ; Thangaraj, K. (2004). Phylogeography and origen of Indian domestic goats. *Mol. Biol. Evol.* v. 21, n.23, pp. 454-462.

Kimura, M. and Crow, J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. v. 49, pp. 725-738.

Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. v. 217, pp. 624–626.

Li, M. H.; Zhao, S. H.; Bian, C.; Wang, H. S.; Weid, H.; Liu. B.; Yu, M.; Fan, B; Chen, S.L. Zhu, M.J.; Lia, S. J.; Xiong, T.A. Li, K. (2002). Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite. *Genetics Selection and Evolution*. v. 34. pp. 729-744.

Launey, S.; Barre, M.; Gerard, A.; Cari-Graven, Y. (2001). Population bottleneck and effective size in *Bonamia oastreae*-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markes. *Genet. Res. Camb.* v. 78, pp. 259-270.

Laval, G.; Iannuccelli, N.; Legault, C.; Milan, D.; Groene, M.A.; Giuffra, E.; Andersson, L.; Nissen, P.H.; Jorgensen, C.B.; Beeckman, P.; Geldermann, H.; Foulley, J-L.; Chevalet, C.; Ollivier, L. (2000). Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis. *Genet. Sel. Evol.* v. 34, pp. 729-744.

Lima, P.J.S.; Souza, D.L.; Pereira, G.F.; Torreão, J.N.C.; Moura, J.F.P.; Gomes, J.T.; Lopez Acosta, J.M.; Rey Sanz, S.; Ribeiro, M.N.; Pimenta Filho, E.C. (2007). Gestão genética de raças caprinas nativas no estado da Paraíba. *Arch. Zootec.* 56 (Sup. 1), pp. 623-626.

Luikart, G.; Cournuet, J-M. (1998). Empirical of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conser. Biology.* v. 12, n 1, pp. 228-237.

Luikart, G.; Biju-Duval, M-P.; Ertugrul, O. ; Zagdsuren, Y. ; Maudet, C. and Taberlet, P. (1999). Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics.* v. 30. pp. 431-438.

Luikart, G.; Gielly, L.; Excoffier, L.; Vigne, J-D.; Bouvet, J.; Taberlet, P. (2001). Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *PNAS.* v. 98. n. 10. pp. 5927-5932.

MacNeil, M. D.; Cronin, M. A.; Blackburn, H. D.; Richards, C. M.; Lockwood, D. R. and Alexander, L. J. (2007). Genetic relationships between feral cattle from Chirikof Island, Alaska and other breeds. *Animal Genetics.* v. 38. pp. 193-197.

Mariante, A. S. (1999). Situação atual da conservação de recursos genéticos animais no Brasil, In: **SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC. 2..** Brasília, Mesa redonda, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. CD-ROM. 5p.

Martínez, A..M.; Menezes, M. P.C; Acosta, J.M.; Rodriguez-Gallardo, P.P.; Cabello, A.; Camacho, M.E.; Delgado, J.V. (2004). Genetic characterisation of the Blanca Andaluza Goats base don microsatellite markers. *South African Jour. of Anim. Sci.* v. 34, n. 1, pp. 17-19.

Martínez, A.M.; Vega-Pla, J.L.; Lozano, J.M.; Carrera, M.P.; Acosta, J.M.; A. Cabello. (2005). Caracterización genética de la cabra Murciano-Granadina con microssatélites. *Arch. Zootec.* v.54, pp. 327-331.

Martínez, A.M.; Vega-Pla, J.L.; Menezes, M.P.C.; Ribeiro, M.N.; Sousa, C.; Camacho, M.E.; Revidatti, M.A.; Galarza, Sponenberg, A.; Seguí, P. B.; Rocha, L. L.; Chacón, E.; Capote, J.; Amills, M.; Gama, L.T.; Delgado, J.V. (2007). Relaciones genéticas entre razas caprinas Ibéricas y Latinoamericanas. *In: III SIMPOSIO LATINO AMERICANO SOBRE LA CRIANZA EN FORMA SUSTENTABLE DE PEQUEÑOS RUMINANTES Y CAMELIDOS SUDAMERICANOS. 2007. ABANCA Y, ARTICULOS DE INVESTIGACION, ABANCA Y : NILTON CESAR GOMEZ URVIOLA.*

Maudet, C. (2001). *Diversité et caractérisation génétique des races bovines et caprines originaires de la region Rhône-Alpes.* 2001. 165 fls. Thèse. Docteur en Biologie. Université Joseph Fourier.

Maudet, C. ; Miller, C.; Bassano, B.; Breitenmoser-Würsten, C.; Gauthier, D.; Obexer-Ruff, G.; Michallet, J.; Taberlet, P.; Luikart, G. (2002). Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex (*Capra ibex (ibex)*). *Mol. Ecol.* v. 11. pp. 421-436.

Menezes, M. P. C.; Martínez, A. M.; Ribeiro, M. N.; Filho, E. C. P.; Bermejo, J. V. D. (2006). Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *R. Bras. Zootec.* v.35, n.4, pp.1336-1341.

Menezes, M. P. C. (2005). *Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias.* 2005. 111fls. Tese (doutorado em Zootecnia) – Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia - Universidade Federal da Paraíba – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Universidade Federal do Ceará.

Mommens, G.W.; Coppieters, A. (1994). Dinucleotide repeat polymorphism at the bovine MM12E6 and MM8D3 loci. *Animal Genetics.* v. 25, pp. 368.

Moore, S. S.; Byrne, K. (1993). Dinucleotide polymorphism at the bovine calmodulin independent adenylylase locus. *Animal Genetics*. v. 24, pp. 150.

Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* v.41, pp. 225-233.

Nei, M.; Maruyama, T.; Chakraborty, R. (1975). The Bottleneck effect and genetic variability in population. *Evolution*. v. 29, pp. 1-10.

Nei, M.; Tajima, F.; Tatenno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data, II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*. v. 19, pp. 153-70.

Ohta, T.; Kimura, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet. Res. Camb.* v. 22. pp. 201-204.

Oliveira, R. R.; de ; Egito, A. A. do ; Ribeiro, M. N. ; Paiva, S. R.; Albuquerque, M. do S. M.; Castro, S. R.; Mariante, A. da S.; Adrião, M. (2005). Caracterização genética da raça caprina Moxotó por marcadores RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasil, v. 40, n. 2, pp. 233-239.

Oliveira, J.C.V. de; Rocha,L.L. da; Ribeiro, M.N. and Gomes Filho, M.A. (2006). Caracterização e perfil genético visível de caprinos nativos no Estado de Pernambuco. *Arch. Zootec.* 55 (209), pp. 63-73.

Oliveira, J. D. de; Igarashi, M. L. S de P.; Machado, T. M. M.; Miretti, M. M.; Ferro, J. A.; Contel, E. P.B. (2007). Structure and genetic relationships between Brazilian naturalized and exotic purebred goats domestic goat (*Capra Hircus*) breeds on microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 2, pp. 356-363.

Oliveira, J.C.V. **Variabilidade Genética em Caprinos**. (2007). 104 f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) – Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia - Universidade Federal da Paraíba – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Universidade Federal do Ceará.

Paetkau, D.; Waits, L. P.; Clarkson, P. L.; Craighead, L.; Vyse, E.; Ward, R.; Strobeck, C. (1998). Variation in genetic diversity across the range of north American brown bears. *Conservation Biology*, v. 12, n. 2, pp. 418-429.

Paulino, C. D.; Turkman, M. A. A.; Murteira, B. (2003). *Estatística bayesiana*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, 446 p.

Pearse, D. E. and Crandall, K. A. (2004). Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*. v. 5, pp. 585–602.

Piry, S., G. Luikart and J. M. Cornuet. (1999). Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. v. 90, n. 4, pp. 502-503.

Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data . *Genetics*. v. 155, pp. 945–959 (June 2000).

Qi, Y.; Luo, J.; Han, X. F.; Zhu, YZ, Chen, C.; Liu, JX; Sheng, H. (2009). Genetic diversity and relationships of 10 chinese goat breeds in the Middle and Western China. *Small Ruminant Research*. v. 82. pp. 88-93.

Ranala, B; Mountain, J. L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Genetics*. v. 94, August, pp. 9197–9201.

Ribeiro, M. N. ; Gomes Filho, M. A.; Bermejo, J. V. D.; Valejo, M. E. C. ; Oliveira, J. C. V.; Cruz, G. R. B.; Rocha, L. L. da; Silva, R. C. B. da; Menezes, M. P. C.; Pimenta Filho, E. C.; Brito, M. P. de . **CONSERVAÇÃO DE RAÇAS DE CAPRINOS NATIVOS DO BRASIL: HISTÓRICO, SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS**. 1. ed. Recife: Maria Norma Ribeiro, 2004. v. 1. 62 p.

Robinson, I.P. (1998). Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: Alfenas, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*. Viçosa. Ed.UFV. pp. 329-380.

Rocha, L. L.; Benício, R.C.O.; Oliveir, J.C.V.; Ribeiro, M.N.; Lara, M.A.C.; Gomes Filho, M.A.; Ribeiro, J.A. (2007). Uso de Polimorfismo de proteínas no estudo genético de caprinos da raça Moxotó. *Arch. Zootec.* 56 (215), pp. 287-298.

Rosenberg, N. A.; Burke, T.; Elo, K.; Feldman, M. W.; Freidlin, P. J.; Groenen, M. A. M.; A.Vignal Hillel, J; Maki-Tanila, A.; Tixier-Boichard, M.; Wimmers, K.; Weigend, S. (2001). Empirical Evaluation of Genetic Clustering Methods Using Multilocus Genotypes From 20 Chicken Breeds. *Genetics.* v. 159, (October). pp. 699–713.

Rosenberg, N. A.; Pritchard, J.K.; Weber, H. M. C.; Kidd, K. K.; Zhivotovsky, L. A.; Feldman, M.W. (2002). Genetic structure of human populations. *Science.* v. 298, pp. 2381-2384.

Saitbekova, N. Gaillard, C. Obexer-Ruff, G. Dolf, G. (1999). Genetic diversity Swiss goat breeds bases on microsatellite analysis. *Animal Genetics.* v. 30, pp. 36-41.

Sechi, T.; Usai, M.G.; Miari, S.; Mura, L.; Casu, S.; Carta, A. (2007). Identifying native animals in crossbred populations: the case of the Sardinian goat population. *Animal Genetics.* v. 38. pp. 614-620.

Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics.* v. 139, pp. 457-462.

Solé-Cava, A. M. (2001). Biodiversidade Molecular e genética da Conservação. In: Matioli, S. R. *Biologia Molecular e Evolução.* Ribeirão Preto. Ed. Holos, pp. 172 – 192.

Solinas-Toldo, S. e Fries, R. (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome.* v. 4, pp. 720-727.

Torres, A. P. (1984). **Melhoramento dos rebanhos: noções fundamentais.** 3 ed. – Ed. Nobel. 399 p.

Vaiman D.; Mercier D.; Moazami-Goudarzi K.; Eggen A.; Ciampolini R.; Lépingle A.; Velmala R.; Kaukinen J.; Varvio S.L.; Martin P.; Levéziel H.; Guérin G. (1994). A set of 99

cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome*. v.5, pp. 288-97.

Valiente, J. Q. (2007). *Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas*. Tese. 2007. 155fls. Universidade de Córdoba – Departamento de Genética. Espanha.

Visser, C.; Hefer, C.A.; Marle-Köster, E. V.; Kotze, A. (2004). Genetic variation of three commercial and three indigenous goat populations in South Africa. *South African Journal of Animal Science*. 34 (Supplement 1). pp. 24-26.

Yang, L.; Zhao S. H.; Li, K.; Peng, Z.Z.; Montgomery, G.W. (1999). Determination of relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. *Animal Genetics*. v. 30, n. 6, pp. 452-456.

Wang, J. (2001). A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genet. Res. Camb.* v. 78, pp. 243-257.

Wright, S. (1931). Evolution in mendelian populations. *Genetics*. v. 16, p. 97-159

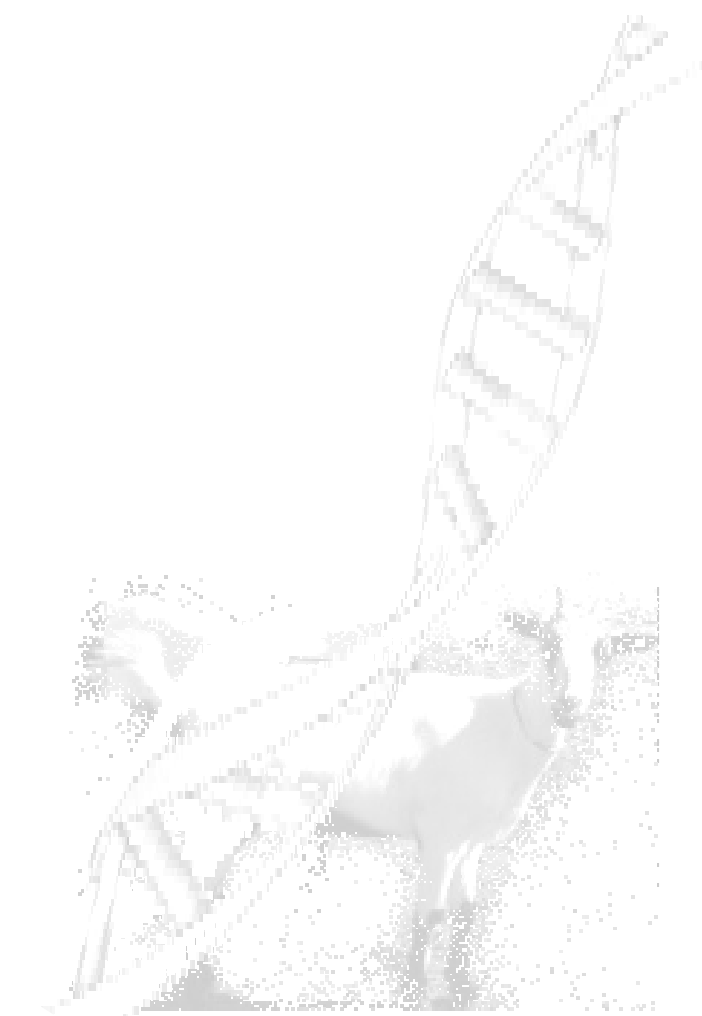
6.1. Referências da web

Belkhin, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N.; Bonhomme, F. (2003). Genetix, v. 4.04, Logiciel sous WindowsTM pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome et Population, Université Montpellier 2, Montpellier. See <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>.

Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S. (2006). *Arlequin ver. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis*. URL:<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>

ISAG. *International Society of Animal Genetics*. (2002). <http://www.isag.org.uk>

Rosenberg, N. A. (2003). **Distruct: a program for the graphical display of population structure**. Program in Molecular and Computational Biology University of Southern California 1042 W 36th Place, DRB 289 Los Angeles CA 90089, USA. <http://www.cmb.usc.edu/~noahr/distruct.html>



CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

Uso de inferência clássica e bayesiana para análise das relações genéticas e estudo da estrutura genética de populações caprinas através de marcadores microsatélites

Resumo

A disponibilidade de várias medidas de distâncias genéticas, desde as clássicas até aquelas obtidas a partir de métodos bayesianos, acoplados a sofisticados programas computacionais e técnicas moleculares, como os marcadores microsatélites, vêm sendo incorporados às análises genéticas de estudos populacionais. O presente trabalho teve como objetivos avaliar as relações genéticas por meio de duas distâncias genéticas (D_A e *Reynolds*) e a estrutura das populações pelos métodos das frequências e bayesiano, de 511 caprinos distribuídos em 14 populações (SRD, seis conhecidos como caprinos locais do Nordeste brasileiro (Azul, Canindé, Graúna, Marota, Moxotó, Repartida); quatro rebanhos exóticos (Alpina, Anglo-Nubiana, Boer e Saanen); e três rebanhos espanhóis (Granadina, Murciano e mestiço Murciano-Granadina), com 23 marcadores microsatélites (TGLA122, ETH10, INRA63, BM1329, BM6506, BM6526, BM8125, CSSM66, ETH225, CSRM60, SPS115, MM12, ILSTS011, MAF209, MAF65, SRCRSP8, OarFCB11, OarFCB48, OarFCB304, HSC, McM527, BM1818, CSRD247). Em seguida realizou-se nova análise com os 13 microsatélites mais informativos e polimórficos (BM 1329, BM 8125, BM1818, CSRD247, HSC, MM12, SRCRSP8, ILSTS011, TGLA122, BM6526, McM527, FCB11 e OarFCB304). Com base nas distâncias estimadas através dos 23 microsatélites, observou-se que as populações locais apresentavam-se mais próximas entre si e distantes das exóticas e espanholas. Os animais SRD apresentaram-se próximos de algumas populações locais e exóticas. Resultados semelhantes foram obtidos nas análises realizadas com os 13 microsatélites, e as distâncias obtidas com base no uso de 23 e 13 microsatélites apresentaram-se altamente correlacionadas. Pelos métodos das frequências e bayesianos, foi possível classificar os indivíduos à sua respectiva população de origem. As populações Boer e Anglo-Nubiana apresentaram 100% de indivíduos agrupados a suas populações de origem, pelo método frequentista. Para os demais grupos observaram-se que alguns indivíduos foram classificados em populações diferentes da sua origem, principalmente as nativas entre si e as espanholas. Com o método bayesiano foi possível uma correta classificação de 85,3% dos animais, dos quais 34,04% foram corretamente classificados na sua população de origem (análise com 23 microsatélites). Na análise com 13 microsatélites, 82,6% dos animais foram corretamente classificados, sendo 36,16% corretamente classificados à sua população de origem. Os resultados demonstraram que a combinação de diferentes metodologias forneceu maior acurácia destes e o uso reduzido de marcadores, sendo estes mais informativos, forneceu resultados condizentes.

Palavra-chave: Distâncias genéticas, método frequentista e bayesiano

Use of classic and Bayesian inference for the study of genetic relations and structuring in goat populations using microsatellite markers

Summary

The availability of different genetic distance measures – from classic to Bayesian methods – coupled to sophisticated computational programs and molecular methods, such as microsatellite markers, have been incorporated to genetic analyses in population studies. The aim of the present study was to assess genetic relations using two genetic distances (D_A and *Reynolds*) and population structuring using frequency and Bayesian methods through the study of 23 microsatellite markers (TGLA122, ETH10, INRA63, BM1329, BM6506, BM6526, BM8125, CSSM66, ETH225, CSRM60, SPS115, MM12, ILSTS011, MAF209, MAF65, SRCRSP8, OarFCB11, OarFCB48, OarFCB304, HSC, McM527, BM1818, CSRD247) in 511 goats distributed among 14 populations [one group with no defined breed; six groups of known local breeds in northeastern Brazil (Azul, Canindé, Graúna, Marota, Moxotó, Repartida); four exotic breeds (Alpine, Anglo-Nubian, Boer and Saanen); and three Spanish breeds (Granadina, Murciano and the Murciano-Granadina mixed breed)]. A second analysis was performed with the 13 most informative and polymorphic microsatellites (BM 1329, BM 8125, BM1818, CSRD247, HSC, MM12, SRCRSP8, ILSTS011, TGLA122, BM6526, McM527, FCB11 e OarFCB304). Based on the distances estimated from the 23 microsatellites, the local populations proved more closely related to each other and distant from the exotic and Spanish breeds. The goats with no defined breed were closely related to some local and exotic populations. Similar results were obtained with the 13 microsatellites. The distances determined based on the use of 23 and 13 microsatellites were highly correlated. The frequency and Bayesian methods allowed classifying the individuals in their respective populations of origin. The frequency method grouped 100% of the Boer and Anglo-Nubian individuals in their populations of origin. Some of the remaining individuals were classified in populations other than their population of origin, especially the local and Spanish individuals. In the analysis with 23 microsatellites, the Bayesian method correctly classified 85.3% of the animals, 34.04% of which were correctly classified in their population of origin. In the analysis with 13 microsatellites, this method correctly classified 82.6% of the animals, 36.16% of which were correctly classified in their population of origin. The results demonstrate that a combination of different methods provides greater accuracy and that the use of a smaller number of more informative markers provides similar results to the use of a greater number of markers.

Keyword: Genetic distances, frequentist and Bayesian method

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico em biodiversidade e caracteriza-se pelo crescimento da conscientização da conservação de seus recursos genéticos animais e vegetais. Com o crescimento econômico do país, veio também a modernização da agricultura e, muitos dos recursos genéticos animais foram deixados de lado, concomitantemente à introdução de espécies exóticas, causando a deriva genética desses materiais considerados nativos. Barker (1994) relata que é interessante manter a diversidade genética máxima de cada espécie, prevendo a necessidade para o desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis, uma vez que não é possível prever com objetividade quais características podem ser necessárias no futuro.

Atualmente, os estudos com genética clássica têm sido auxiliados pela genética molecular, que se moderniza a cada dia, e permite elucidar dúvidas quanto à possível origem de um indivíduo e a correção de paternidades errôneas, além de melhorar a acurácia de estudos referentes às análises das relações genéticas em animais domésticos. Esta última sendo uma etapa considerada importante para os programas de conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais, uma vez que irá fornecer informações acerca da diversidade genética, além de servi como base para se conhecer a estratificação das populações estudadas.

A tecnologia molecular vem promovendo a descoberta de um grande número de marcadores de considerável polimorfismo, o que permite analisar a variabilidade genética e a estruturação evolutiva de populações (Estoup e Angers, 1998; Cornuet et al., 1999).

Nos últimos anos, a utilização de métodos para análise de populações a nível molecular vem crescendo, dentre eles estão os estudos da diversidade genética entre e dentro de populações, seguindo uma estruturação hierárquica e as relações genéticas entre estas.

Muitos trabalhos demonstram os benefícios do uso de marcadores altamente polimórficos, como os marcadores microssatélites que são facilmente amplificados por PCR, para os estudos da diversidade e rebanhos relacionados (Laval et al., 2002). A importância desses estudos se deve ao fato do entendimento da ecologia e das forças evolutivas que promovem mudanças nas populações (Schneider, 2007). Dada essa complexidade, a variação entre indivíduos ou populações é analisada por um determinado método ou uma combinação deles (Alcochete, 2005). Segundo Karp et al. (1997a; 1997b) cada tipo de dado fornece diferente informação e a escolha do(s) método(s) analítico(s) vai depender dos objetivos do experimento, do nível da resolução desejada, dos recursos e infra-estrutura tecnológica disponível, das dificuldades operacionais e do tempo.

Esses estudos são complexos e não é fácil conhecer todas as características de suas populações alvo. Nesse contexto, a inferência é bastante útil, pois a partir de subconjuntos de valores, de dimensões bem menores, possibilita a extrapolação a um grande conjunto de dados, das informações e conclusões. As primeiras técnicas de *Inferência* surgiram com os trabalhos de Bayes, DeMoivre, Gaus e Laplace há mais de 200 anos (Cordeiro, 1992) e o aspecto inferencial ou preditivo pode ser considerado importante nestes estudos (Paulino et al., 2003). De acordo com Gusmão (2008), a inferência tem como objetivo prover regras apropriadas de natureza científica baseando-se em um conjunto de dados para executar algumas tarefas, tais como estimação, construção de intervalos de confiança e desenvolvimento de teste de hipóteses.

Atualmente, dispõe-se de várias técnicas que avaliam a diversidade juntamente com a estrutura genética das populações. Esses agrupam indivíduos a populações e tem sido auxiliado tanto pela inferência clássica como por métodos baseados nas distâncias e probabilísticos (Nei, 1972; Nei, 1973; Nei 1978; Nei et al., 1983; Reynolds et al., 1983; Paetkau et al., 1995), além da inferência bayesiana. Este método incorpora informações prévias ao procedimento de estimação, as quais são especificadas pela distribuição *a posteriori* α *a priori* \times *verossimilhança*, como os métodos propostos por Rannala e Mountain (1997), Cournut et al. (1999) assumem o EHW e/ou de ligação dos dados do genótipo de cada indivíduo (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003).

Nei (1973) define a distância genética como sendo a diferença entre duas entidades que podem ser descritas pela variação alélica. Esta definição foi posteriormente melhorada por Nei (1987) como sendo “qualquer medida quantitativa da diferença genética, em nível de seqüência ou freqüência alélica, que é calculada entre indivíduos, populações ou espécies”.

Segundo Laval et al. (2002) a aparente diversidade das distâncias genéticas pode ser estruturada em dois ou três grupos principais: as distâncias baseadas em distribuições de freqüências alélicas - Euclidiana e distâncias angulares - e as distâncias baseadas nas distribuições do tamanho dos alelos.

Em caprinos, a estimativa dessas distâncias com uso de marcadores microssatélites tem sido largamente utilizada para estudo de diversidade e caracterização genética, empregando-se *softwares* cada vez mais completos e que permitem resultados precisos. Na literatura encontram-se trabalhos utilizando de muitos marcadores. Quais e quantos marcadores se utilizar? São perguntas que sempre está em volta com o pesquisador.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar diferentes métodos, verificando as respostas obtidas com 23 marcadores e depois com os microssatélites mais informativos que fornecessem os mesmos resultados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostra animal e microssatélites analisados

A princípio realizou-se uma análise com os 27 microssatélites, mas devido a dados perdidos e desequilíbrio em quatro marcadores (INRA05, INRA06, INRA23 e HAUT27), foram utilizados 23 (TGLA122, ETH10, INRA63, BM1329, BM6506, BM6526, BM8125, CSSM66, ETH225, CSRM60, SPS115, MM12, ILSTS011, MAF209, MAF65, SRCRSP8, OarFCB11, OarFCB48, OarFCB304, HSC, McM527, BM1818, CSRD247), em 511 caprinos distribuídos em 14 populações: Azul (40), Canindé (40), Graúna (39), Marota (40), Moxotó (40), Repartidas (40) e um grupo Sem padrão racial definido (40), sendo os seis primeiros conhecidos como caprinos locais brasileiros do nordeste brasileiro; quatro amostras de raças exóticas: Alpina (40), Anglo-Nubiana (26), Boer (40) e Saanen (36); e três populações espanholas: Granadina (35), Murciano (35) e um rebanho de seus cruzamentos a Murciano-Granadina (20).

2.2. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas em duas etapas: Primeiramente utilizou-se os métodos das distâncias genéticas com auxílio do software *Population* v. 1.2.28 (Olivier Langella, <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/>). A princípio foram empregados vários cálculos de distâncias diferentes, observando-se as diferenças entre as matrizes de dados gerados. Neste estudo foram propostas duas distâncias, a D_A de Nei et al. (1983) e a de Reynolds (D_{Reynolds}) (Reynolds et al., 1983).

A D_A de Nei (Nei et al., 1983) é uma modificação da medida de Cavalli-Sforza's (f_θ) (1969), que consistiu na tentativa de eliminar uma deficiência apresentada por f_θ . Essa deficiência consistia em número de baixa – frequências alélicas (alelos raros) na amostra, o que não contribuía muito para a média da diferenciação gênica entre populações (Nei et

al.,1983). Desta forma a D_A permite remover essa deficiência, a qual tem sido recomendada por Takezaki y Nei (1996) para dados de distâncias utilizando microssatélites.

$$D_A = 1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i}$$

A distância de Reynolds (D_{Reynolds}) introduz a distância mínima de Nei (D_m) e utiliza-se do coeficiente de coancestralidade, em evolução para um curto período de tempo, na qual o modelo proposto baseia-se no modelo “deriva”, sendo esta a única força considerada capaz de promover divergência das frequências, em que a mutação e outras forças que alteram as frequências gênicas são desconsideradas (Reynolds et al., 1983).

$$D_{\text{Reynolds}} = \frac{1}{2} \frac{\sum_i (px_i - py_i)^2}{1 - \sum_i (px_i py_i)} = \frac{D_m}{1 - j_{xy}}$$

A partir destas análises foram construídas as árvores de distâncias através do agrupamento do vizinho mais próximo (NJ) (Saitou e Nei, 1987), com 1.000 permutações para reamostragem. Este método faz parte do grupo de métodos de evolução mínima, e o algoritmo procura a árvore de menor soma dos ramos (Cavalli-Sfoza e Edwards, 1967). Este algoritmo heurístico é chamado de vizinhos, a evolução mínima está implícita a cada passo do algoritmo, e produz uma árvore final. O método UPGMA (Sneath e Sokal, 1973), apesar de ser um dos métodos de reconstrução filogenética e um dos mais utilizados com dados microssatélites (Arranz et al., 1996), (Cañon et al., 2000), (Li et al., 2000), não foi apresentado neste trabalho pelo fato de seu algoritmo assumir o relógio molecular para a construção da topologia, ou seja, assume que todas as linhagens evoluem a uma taxa constante de evolução.

As distâncias foram correlacionadas com auxílio do procedimento PROC CORR do pacote estatístico SAS (2001).

Em seguida foi realizada a discriminação entre as diferentes populações de caprinos pelo programa *GeneClass 2* (Piry et al., 2004). Os métodos utilizados pelo programa se baseiam na verossimilhança, que é um método de inferência filogenética com base teórica mais estritamente ligada à teoria da máxima verossimilhança de Fisher. Esse método requer um modelo probabilístico de evolução dos caracteres e pode levar em consideração

parâmetros como taxa de substituição entre pares de nucleotídeos em uma sequência de DNA, frequências de bases, entre outros (Nei e Kimura, 2000), realizando assim uma classificação de indivíduos às populações de origem. Os respectivos testes (probabilístico-frequentista e bayesiano) realizados forma através dos métodos:

1) Direto, que está baseado nas frequências gênicas, descrito por Paetkau et al. (1995), onde o genótipo do indivíduo é agrupado à população mais provável de ocorrência. Este método consiste em três princípios básicos: a) calcula a frequência alélica em todas as populações; b) calcula a probabilidade do genótipo multilocus do indivíduo ocorrer em cada população e, c) agrupa o indivíduo à população em que a probabilidade do genótipo deste é alta para a população designada.

2) Bayesiano (Rannala e Mountain, 1997) – é um método que recorre a procedimentos Bayesianos para o cálculo das frequências alélicas e a simulações de genótipos de forma a possibilitar a definição de um grau de confiança para a classificação/exclusão dos indivíduos nas diversas populações (Fórmulas 9, 23, 24 e 25 de Rannala e Mountain (1997)). É um método que é realizado da mesma forma que o das frequências, sendo até mais simples, pois as dificuldades que se tinha com o método anterior (frequências nulas) desaparecem devido ao coeficiente $\frac{1}{K_j}$, que resulta dos cálculos, onde K_j é o número total de alelos observados em todo o conjunto de populações no locus j . O último método foi analisado utilizando-se o algoritmo de simulação modificado por Cornuet et al. (1999), que assume o EHW e equilíbrio de ligação, com uma simulação de 10.000 e *alpha* de 0,05.

Em seguida, realizou-se uma nova análise com os microssatélites considerados mais informativos, de acordo com os resultados obtidos (Anexo), como EHW de cada marcador em cada população, além do conteúdo de informação polimórfica (PIC) e heterozigosidade.

3. RESULTADOS

3.1. Distâncias Genéticas

Na Tabela 1 encontram-se as distâncias $D_{Reynolds}$ entre as populações nativas que foram as menores (Graúna e Azul; Moxotó e Canindé, esta e a Repartida e Repartida com a Moxotó), juntamente estas com a SRD e desta última com as exóticas, quando comparadas a outras populações. Entre as raças exóticas, a Alpina e Saanen apresentaram as menores distâncias (0,069) porém, para as populações espanholas, Murciano e Murciano-Granadina, foram as que apresentaram-se mais próximas geneticamente (0,010).

Com base na distância D_A , os menores valores são observados entre as nativas e a SRD, as populações espanholas Murciana e Murciano-Granadina (0,066) e as exóticas com 0,162 para a Alpina e Saanen. As maiores distâncias foram obtidas entre as nativas com as demais populações (exóticas e espanholas) para ambas as distâncias (D_A e $D_{Reynolds}$). Percebe-se que as duas matrizes obtidas (Tabela 1) com diferentes metodologias mostraram proporções similares em relação às distâncias, quando comparadas às populações estudadas.

Com a utilização de 13 microssatélites (BM1329, BM8125, BM1818, CSRD247, HSC, MM12, SRCRSP8, ILSTS011, TGLA122, BM6526, McM527, OarFCB11 e OarFCB304), observa-se na Tabela 2 relações similares quanto às distâncias entre as populações analisadas com 23 microssatélites (Tabela 1). Estes microssatélites foram escolhidos como base no EHW, PIC e diversidade genética apresentada por eles. As raças exóticas Anglo-Nubiana e Boer foram as que apresentaram as maiores distâncias, pelos dois métodos.

A partir das matrizes de distâncias genéticas (Tabela 1 e Tabela 2) foi possível a construção de árvores genéticas segundo o método NJ (Figura 1A e 3A) com 23 microssatélites e para os 13 microssatélites mais informativos (Figuras 1B e 2B), mostrando apenas as relações de topologia entre as OTUs, sem, no entanto, indicar a posição em que se encaixa a espécie ancestral de todo o grupo.

As árvores não dão informações sobre quais raças são as mais antigas, apenas as relações genéticas entre elas, onde o dendrograma delineado permite identificar grupos e raças que estão em concordância com os dados históricos e origem geográfica das populações estudadas, como é o caso das três populações espanholas, e as nativas, como a Azul e a Graúna e da exótica Alpina e Saanen.

Os dendrogramas (Figuras 2 e 3) demonstraram que alguns grupos não são topologicamente bem definidos, como é o caso das Canindé, Repartida, Marota, que

apresentou baixo valor de *bootstrap*. No entanto, esses se apresentam no mesmo grupo, o que indica relação mais próxima entre estas populações, fato que também pode ser observado para a população SRD.

A árvore de distância obtida com 13 microssatélites pelo método NJ (Figura 3B), de Reynolds, apresentou diferenciação entre os grupos nativos, exóticos e espanhóis, assim como as demais análises (Figuras 1A e 3A).

As correlações entre as distâncias obtidas a partir de 23 e 13 marcadores microssatélites, foram altas e significativas, sendo o maior valor observado entre as distâncias aD_A e bD_A (0,984, $p < 0,001$), o que era de se esperar, uma vez que são as mesmas distâncias, ajustadas ao modelo de alelos infinitos (IAM), apenas com menor número de microssatélites. As menores correlações, porém, significativas, foram observadas entre bD_A e aReynolds (0,895, $p < 0,001$) e aD_A e aReynolds (0,937, $p < 0,001$), para 23 e 13 microssatélites. Mesmo sendo distâncias que podem ser utilizadas para marcadores co-dominantes, a primeira segue um modelo IAM, e a segunda um modelo de deriva puro e utilizado para tempos de divergência curtos, além do número de microssatélites para bD_A e aReynolds . Mesmo retirando-se as populações espanholas, as correlações apresentaram se altas e significativas ($r > 0,90$, $p < 0,001$).

aD_A e aReynolds : uso de 23 marcadores microssatélites.

bD_A e bReynolds : uso de 13 marcadores microssatélites.

Tabela 1. Matriz de distâncias genéticas entre populações obtidas segundo o método de Nei et al. (1983) D_A (diagonal acima) e método de Reynolds et al. (1983) $D_{Reynolds}$ (diagonal abaixo) utilizando 23 microssatélites

	SRD	ALP	BOER	ANG	SAAN	SAZUL	MOX	MARO	CANIN	REPAR	GRAU	MUR	MG	GRAN
SRD	0	0,181	0,288	0,193	0,195	0,189	0,148	0,149	0,138	0,115	0,158	0,214	0,203	0,205
ALP	0,066	0	0,345	0,307	0,162	0,230	0,234	0,203	0,205	0,201	0,173	0,196	0,209	0,186
BOER	0,153	0,182	0	0,353	0,349	0,410	0,398	0,366	0,341	0,341	0,388	0,351	0,323	0,311
ANG	0,089	0,141	0,215	0	0,314	0,370	0,336	0,303	0,315	0,262	0,332	0,306	0,310	0,282
SAAN	0,089	0,069	0,221	0,164	0	0,256	0,257	0,256	0,229	0,219	0,190	0,175	0,164	0,150
SAZUL	0,127	0,154	0,301	0,265	0,210	0	0,128	0,145	0,145	0,143	0,085	0,310	0,300	0,303
MOX	0,085	0,131	0,262	0,225	0,167	0,090	0	0,112	0,102	0,086	0,132	0,311	0,310	0,306
MARO	0,086	0,109	0,227	0,199	0,178	0,093	0,078	0	0,146	0,121	0,132	0,279	0,272	0,275
CANIN	0,069	0,104	0,222	0,194	0,140	0,111	0,048	0,106	0	0,095	0,148	0,262	0,265	0,255
REPAR	0,064	0,103	0,226	0,166	0,120	0,113	0,053	0,089	0,048	0	0,143	0,261	0,241	0,253
GRAU	0,084	0,101	0,253	0,201	0,149	0,039	0,078	0,071	0,094	0,092	0	0,250	0,243	0,237
MUR	0,105	0,078	0,206	0,165	0,085	0,232	0,215	0,180	0,163	0,172	0,172	0	0,066	0,107
MG	0,088	0,074	0,193	0,153	0,058	0,227	0,197	0,171	0,154	0,141	0,161	0,010	0	0,102
GRAN	0,084	0,073	0,180	0,140	0,070	0,225	0,195	0,166	0,153	0,147	0,158	0,037	0,025	0

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas entre populações obtidas segundo o método de Nei et al. (1983) D_A (diagonal acima) e método de Reynolds et al. (1983) $D_{Reynolds}$ (diagonal abaixo) utilizando 13 microssatélites

	SRD	ALP	BOER	ANG	SAAN	SAZUL	MOX	MARO	CANIN	REPAR	GRAU	MUR	MG	GRAN
SRD	0	0,224	0,324	0,212	0,234	0,198	0,170	0,179	0,163	0,136	0,166	0,244	0,236	0,232
ALP	0,078	0	0,421	0,358	0,214	0,262	0,286	0,252	0,259	0,236	0,207	0,248	0,246	0,234
BOER	0,139	0,184	0	0,424	0,416	0,414	0,427	0,409	0,367	0,369	0,423	0,404	0,369	0,360
ANG	0,092	0,157	0,246	0	0,352	0,375	0,379	0,333	0,374	0,295	0,358	0,381	0,366	0,326
SAAN	0,101	0,086	0,238	0,174	0	0,286	0,296	0,330	0,278	0,279	0,225	0,216	0,194	0,189
SAZUL	0,094	0,132	0,243	0,202	0,177	0	0,172	0,185	0,154	0,133	0,109	0,322	0,316	0,333
MOX	0,073	0,123	0,218	0,198	0,146	0,098	0	0,142	0,114	0,081	0,181	0,349	0,346	0,355
MARO	0,103	0,128	0,218	0,206	0,213	0,102	0,087	0	0,182	0,136	0,160	0,332	0,325	0,332
CANIN	0,072	0,115	0,198	0,201	0,144	0,089	0,040	0,122	0	0,101	0,183	0,275	0,292	0,293
REPAR	0,060	0,096	0,197	0,158	0,124	0,075	0,033	0,083	0,046	0	0,174	0,319	0,297	0,309
GRAU	0,073	0,099	0,230	0,180	0,141	0,049	0,104	0,086	0,110	0,090	0	0,274	0,263	0,270
MUR	0,126	0,100	0,227	0,220	0,106	0,193	0,198	0,213	0,156	0,182	0,161	0	0,072	0,131
MG	0,101	0,089	0,208	0,185	0,069	0,192	0,171	0,197	0,149	0,148	0,149	0,012	0	0,119
GRAN	0,093	0,089	0,182	0,157	0,087	0,195	0,169	0,192	0,151	0,147	0,146	0,049	0,033	0

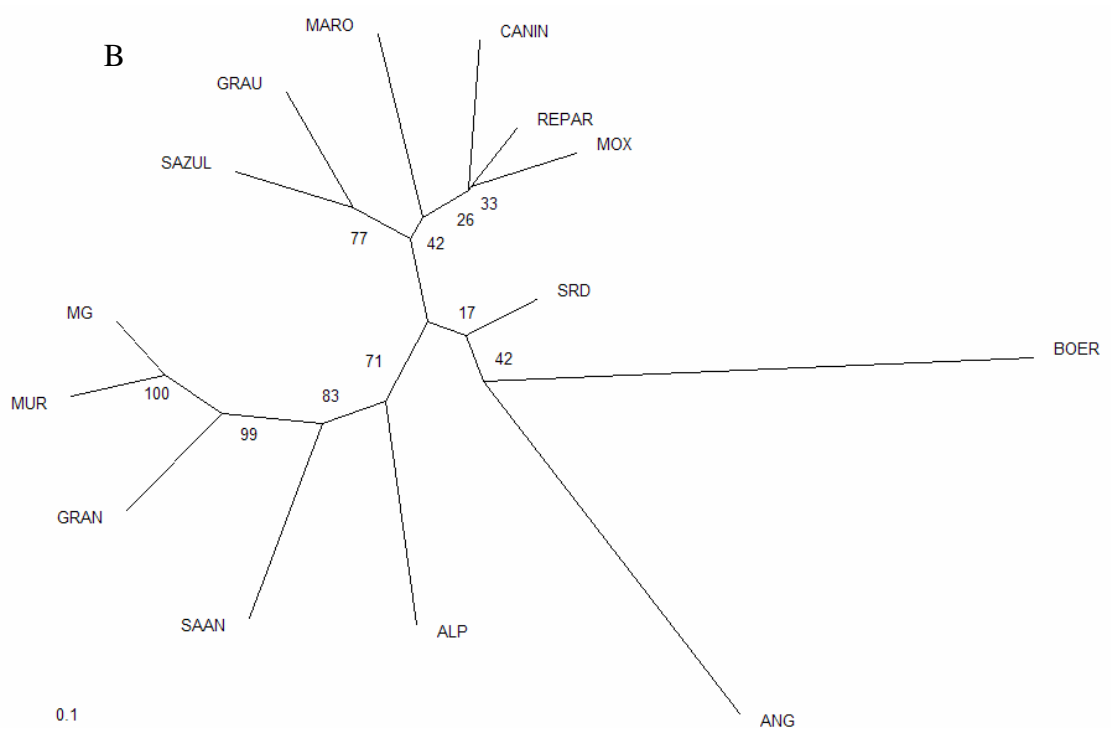
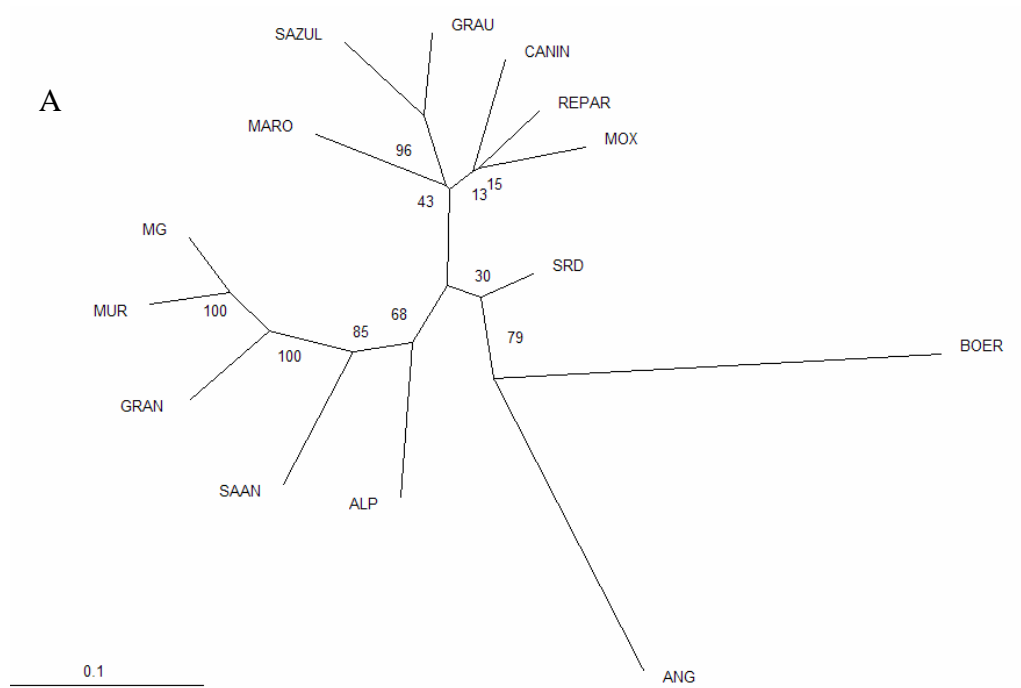


Figura 1. Árvore não enraizada de distância D_A pelo método NJ (Saitou e Nei, 1987): A -23 microssatélites; B- 13 microssatélites

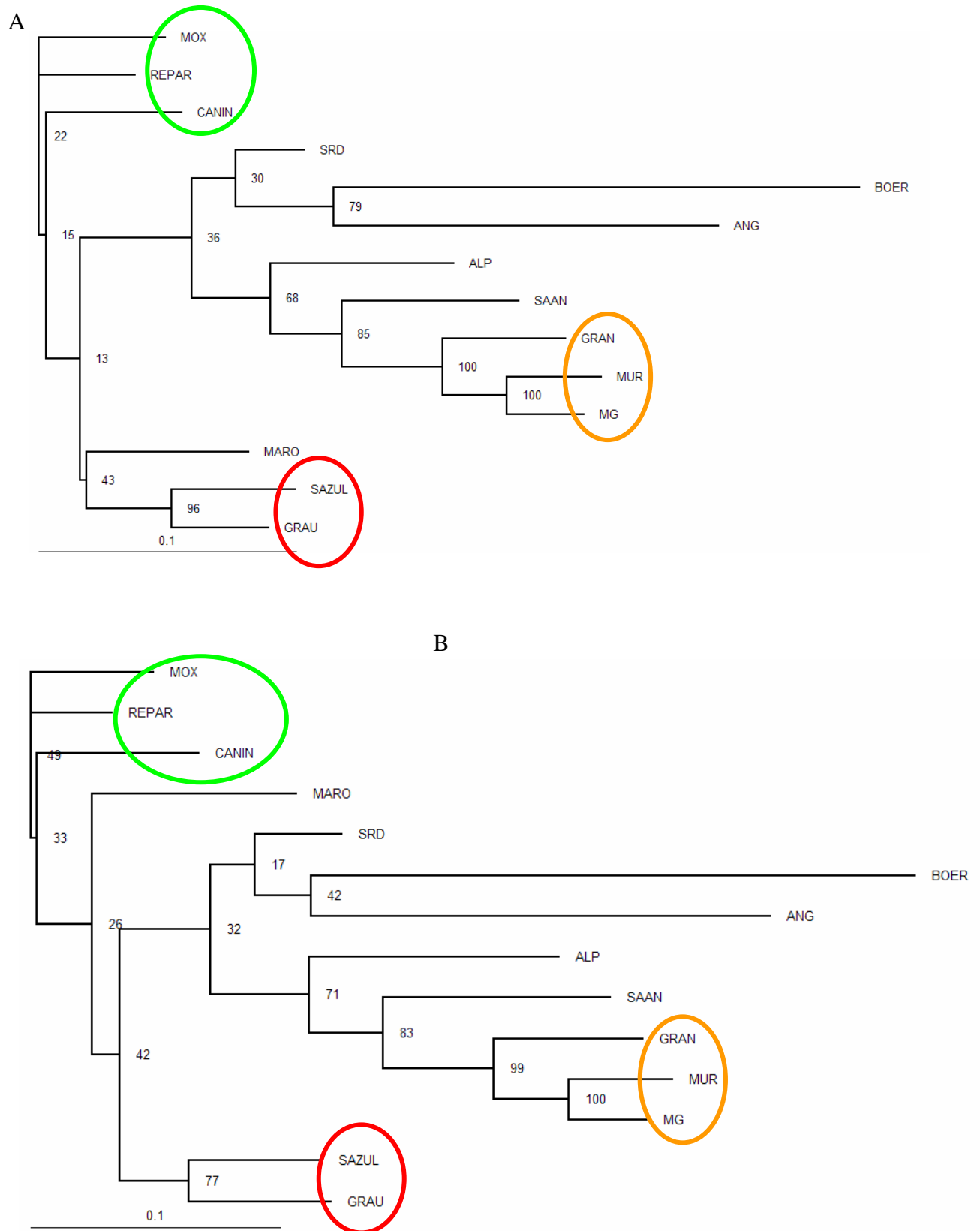


Figura 2. Dendrograma referente a Figura 1. A -23 microssatélites; B- 13 microssatélites

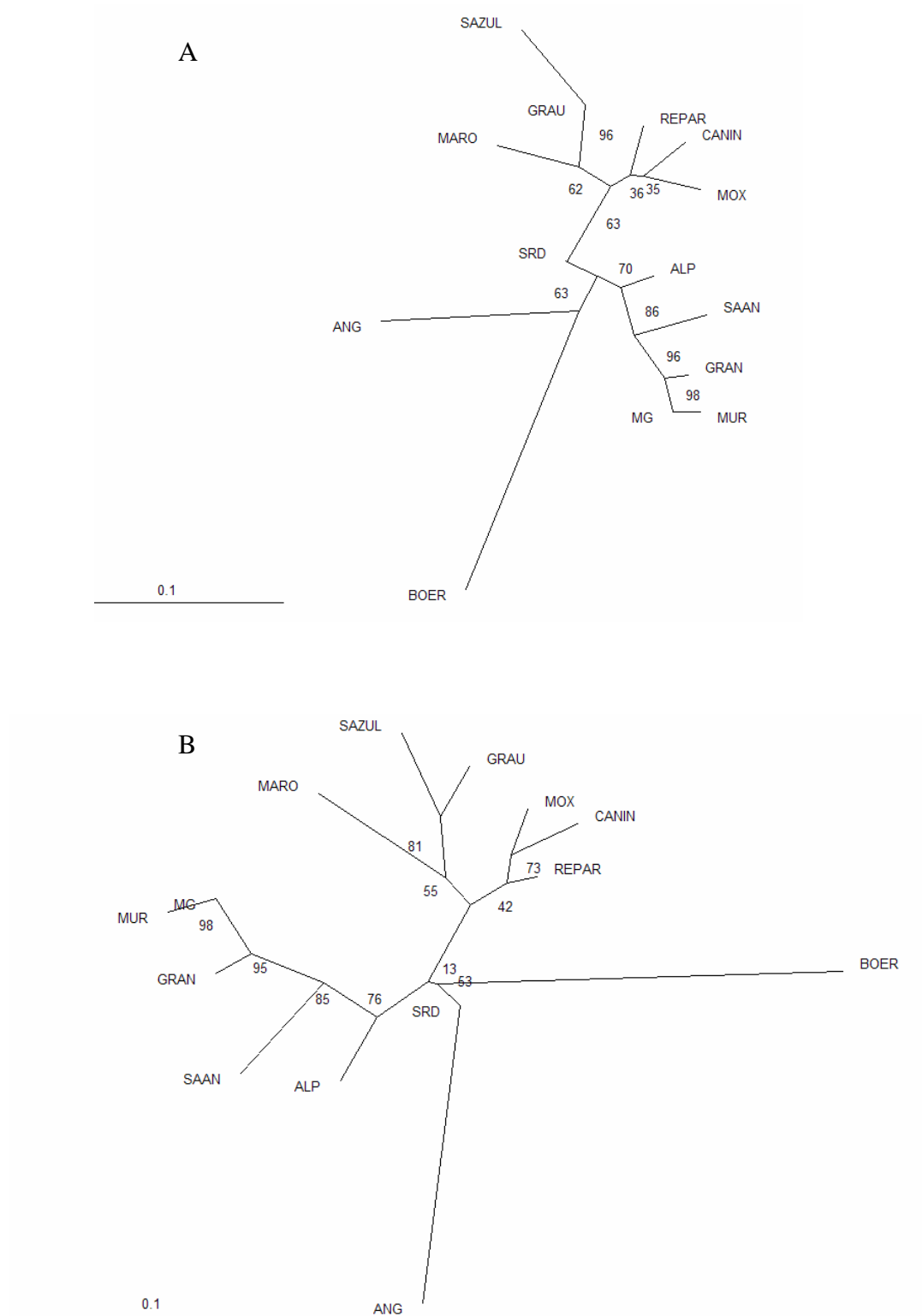


Figura 3. Árvore não enraizada de distância de D_{Reynolds} pelo método NJ (Saitou e Nei, 1987); A - 23 microssatélites; B- 13 microssatélites

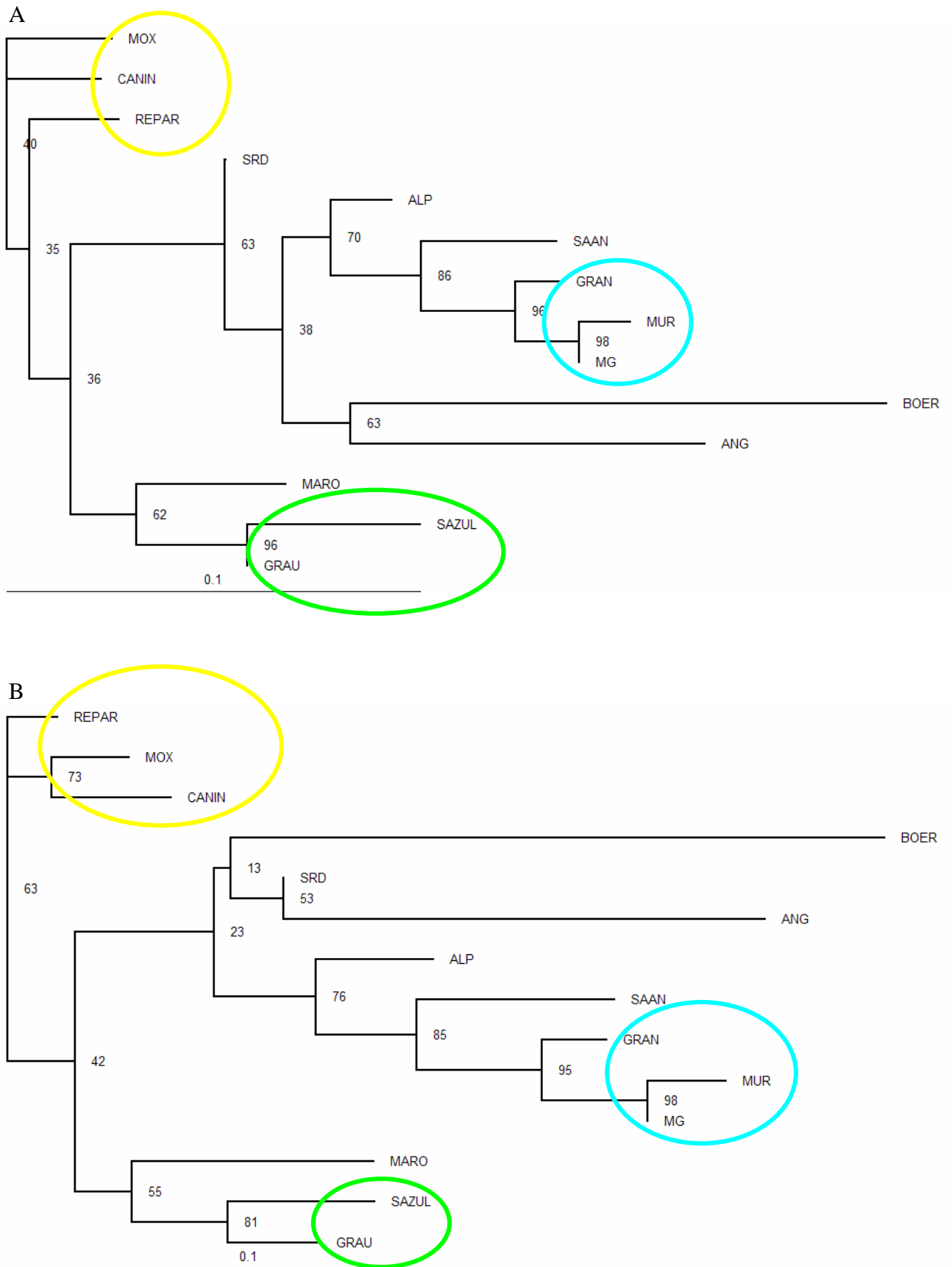


Figura 4. Dendrograma referente a Figura 3. A -23 microssatélites; B- 13 microssatélites

3.2. Designação de indivíduos às respectivas populações de origem

A classificação de indivíduos nas populações de origem através do método desenvolvido por Paetkau et al. (1995), com 23 e 13 marcadores microssatélites, encontram-se nas Tabelas 3 e 4.

Na Tabela 3 observa-se que houve uma correta classificação de 85,3% (436 animais) de indivíduos nas populações onde foram amostrados. E para a tabela 4, para o mesmo método, tem-se 82% (419 animais) de correta classificação. Em ambas as análises, as populações nativas apresentaram níveis de classificação próximas ou semelhantes, a exemplo da Repartida com 65% e a Marota com 90% de indivíduos corretamente classificados em suas populações. A população espanhola Murciana apresentou 77,14% de indivíduos alocados as populações de origem. Apenas as populações Anglo-Nubiana e Boer tiveram o total de animais classificados corretamente (Tabela 3 e 4). Já a população SRD apresentou mais de 80% de classificações corretas nas análises com base em 23 e 13 microssatélites. As menores probabilidades de classificação de indivíduos a população de origem foram obtidas nas populações Murciano-Granadina e Repartida, conforme pode ser observado nas Tabelas 3 e 4, confirmando a existência de mistura de raças: Murciana com Granadina, e no caso da Repartida, verificou-se cruzamentos com outras raças como a Moxotó e Canindé.

Tabela 3. Classificação de indivíduos nas populações de origem pelo método direto, de acordo com Paetkau *et al.* (1995), com base em 23 marcadores microssatélites. Número de indivíduos (N) e percentagem de indivíduos corretamente classificados (%)

População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	N	%
SRD (1)	39	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	40	97,5
Alpina(2)	-	38	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	40	95,5
Boer (3)	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	100
Anglo-Nubiana(4)	-	-	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	100
Saanen (5)	-	1	-	-	32	-	-	-	-	-	-	2	1	-	36	88,88
S.Azul (6)	-	-	-	-	-	35	2	-	1	1	1	-	-	-	40	87,5
Moxotó (7)	-	-	-	-	-	-	36	2	1	-	1	-	-	-	40	90
Marota (8)	-	-	-	-	-	-	3	36	-	-	1	-	-	-	40	90
Canindé(9)	1	-	-	-	-	-	-	1	36	2	-	-	-	-	40	90
Repartida(10)	2	-	-	-	-	1	1	-	10	26	-	-	-	-	40	65
Graúna(11)	1	2	-	-	-	5	-	-	-	-	31	-	-	-	39	79,49
Murciana(12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27	8	-	35	77,14
Mur.-Granadina (13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	4	20	40
Granadina(14)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	7	1	26	35	74,28
Total/Média															511	85,3

Tabela 4. Classificação de indivíduos nas populações de origem pelo método direto, de acordo com Paetkau *et al.* (1995), com base em 13 marcadores microsatélites. Número de indivíduos (N) e percentagem de indivíduos corretamente classificados (%)

População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	N	%
SRD (1)	35			1		2		1			1				40	87,5
Alpina(2)		38			1				1						40	95
Boer (3)			40												40	100
Anglo-Nubiana(4)				26											26	100
Saanen (5)		2			30							1		3	36	83,3
S.Azul (6)						34			3	2	1				40	85
Moxotó (7)					1		30	2	2	5					40	75
Marota (8)							3	36			1				40	90
Canindé (9)	1				1	1	1	1	33	2					40	82,5
Repartida (10)	2					3	3		6	26					40	65
Graúna (11)	3	1				2					33				39	84,61
Murciana (12)												27	8		35	77,14
Mur.-Granadina (13)												10	6	4	20	30
Granadina (14)					1							6	3	25	35	71,43
Total/Média															511	82

O método das frequências gera resultados pouco robustos, uma vez que os indivíduos são sempre classificados a uma das populações analisadas em função da maior probabilidade do seu genótipo, não sendo considerado um grau de confiança para a decisão da inclusão de um indivíduo a uma determinada população. Uma alternativa tem sido a utilização de métodos que envolvem procedimentos bayesianos.

As análises realizadas com o método de Rannala e Mountain (1997) modificado por Cornuet *et al.* (1999) encontram-se nas Tabelas 5, 6, 7 e 8, respectivamente. As Tabelas 5 e 6 referem-se as análises realizadas com 23 microsatélites, e as Tabelas 7 e 8, aquelas realizadas com 13 microsatélites. Observa-se que foi possível uma correta classificação de 85,3%, onde 34,04% dos animais foram corretamente classificados na população em que foram amostrados, e 74,34% excluídos das populações restantes (Tabela 5). Resultados semelhantes podem ser encontrados na Tabela 7, onde 82,6% foram corretamente classificados, sendo 36,16 dos animais corretamente classificados na população em que foram amostrados, e 62,90% excluídos das demais populações.

Nas populações nativas e espanholas, alguns indivíduos, apesar de terem sido amostrados em suas respectivas populações, apresentaram-se como sendo de outras populações (Tabela 5 e 7).

Através destes métodos foi possível identificar os indivíduos classificados incorretamente numa população diferente daquela em que foram amostrados, $P < 0,05$ (Erro); várias populações, como origem de um determinado animal, ou seja, valores de $P < 0,05$ em mais que uma população (Pop+) e; indivíduos excluídos de todas as populações, ou seja, nenhuma população como possível origem deste indivíduo (N.C. - não classificados). Esses resultados encontram-se resumidos nas tabelas 6 e 8. Aproximadamente 35% e 28% dos indivíduos não foram classificados a nenhuma população (Tabela 8).

No total, aproximadamente 4,28% (Tabela 6) e 5,48% (Tabela 8) dos animais, foram classificados incorretamente em população diferente daquela de origem e 25,66% (Tabela 6) e 37,1% (Tabela 8) classificados em várias populações simultaneamente, incluindo também a sua própria população de origem. Algumas populações nativas também apresentaram indivíduos classificados como SRD e também entre as próprias populações de caprinos locais brasileiros, indicativo de mestiçagem. O índice de qualidade do teste bayesiano para os microssatélites estudados foi de 74,25% a 70,69% para 23 e 13 microssatélites, respectivamente.

Tabela 5. Classificação de indivíduos as populações de origem pelo método bayesiano (Rannala e Mountain, 1997) utilizando 23 microssatélites.

Número de indivíduos (N), percentagem de indivíduos corretamente classificados (%), indivíduos excluídos das restantes populações (N_{EXC}) e percentagem de indivíduos excluídos das restantes populações (%_{EXC})

População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	N	%	N _{EXC}	% _{EXC}
SRD (1)	18														40	45	39	97,5
Alpina(2)		20													40	50	40	100
Boer (3)			30												40	75	40	100
Anglo-Nubiana(4)				14											26	53,85	25	96,15
Saanen (5)					20										36	55,55	36	100
Azul (6)						2				1	3				40	5	13	32,5
Moxotó (7)							8				2				40	20	19	47,5
Marota (8)							1	19				1			40	47,5	26	65
Canindé (9)									18						40	45	29	72,5
Repartida (10)	1									19					40	47,5	32	80
Graúna (11)	1										12				39	30,77	28	71,79
Murciana (12)												11	3		35	31,43	20	57,14
Murciana-Granadina (13)												1	0	3	20	0	7	35
Granadina (14)														14	35	40	30	85,71
Total/Média															511	39,04	384	74,34

Tabela 6. Resumo dos resultados da análise pelo método bayesiano, com 23 microssatélites, relativos aos indivíduos incorretamente classificados (Erro), indivíduos incorretamente classificados em mais de uma população (Pop+) ou não classificados (N.C.) e respectivas porcentagens (%)

População	Erro	%	N.C	%	Pop+	%	N
SRD (1)	1	2,5	21	52,5	1	2,5	40
Alpina(2)	0	0,0	20	52,5	0	0,0	40
Boer (3)	0	0,0	10	25	0	0,0	40
Anglo-Nubiana(4)	1	3,84	11	42,31	1	3,85	26
Saanen (5)	0	0,0	16	44,44	0	0,0	36
S.Azul (6)	4	10	11	27,5	27	67,5	40
Moxotó (7)	2	5	11	27,5	21	52,5	40
Marota (8)	2	5	7	17,5	14	35	40
Canindé (9)	0	0,0	11	27,5	11	27,5	40
Repartida (10)	1	2,5	13	32,5	8	20	40
Graúna (11)	1	2,56	16	41,02	11	28,21	39
Murciana (12)	3	8,57	9	25,71	15	42	35
Mur.-Granadina (13)	4	20	7	35	13	65	20
Granadina (14)	0	0,0	16	45,71	5	14,71	35
Total/Média	19	4,28	197	34,48	127	25,66	511

Tabela 7. Classificação de indivíduos as populações de origem pelo método bayesiano (Rannala e Mountain, 1997) utilizando 13 microssatélites.

Número de indivíduos (N), percentagem de indivíduos corretamente classificados (%), indivíduos excluídos das restantes populações (N_{EXC}) e percentagem de indivíduos excluídos das restantes populações (%_{EXC})

População	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	N	%	N _{EXC}	% _{EXC}
SRD (1)	20									1					40	50	37	92,5
Alpina(2)		22													40	55	40	100
Boer (3)			32												40	80	40	100
Anglo-Nubiana(4)	2			7											26	26,92	13	50
Saanen (5)					19								1		36	52,77	35	97,22
S.Azul (6)						3			1	1					40	7,5	12	30
Moxotó (7)	1						5	2	1						40	12,5	14	35
Marota (8)							1	17							40	42,5	21	52,5
Canindé (9)	1								17						40	42,5	19	47,5
Repartida (10)	1						1		2	14					40	35	21	52,5
Graúna (11)	2	1									14				39	35,90	25	64,10
Murciana (12)												6	3		35	17,14	15	42,86
Murciano-Granadina (13)													0	4	20	0	5	25
Granadina (14)														17	35	48,57	32	91,43
Total/Média															511	36,16	329	62,90

Tabela 8. Resumo dos resultados da análise pelo método Bayesiano, com 13 microssatélites, relativos aos indivíduos incorretamente classificados (Erro), indivíduos incorretamente classificados em mais de uma população (Pop+) ou não classificados (N.C.) e respectivas porcentagens (%)

População	Erro	%	N.C	%	Pop+	%	N
SRD (1)	1	2,5	17	42,5	3	7,5	40
Alpina(2)	0	0,0	18	45	0	0,0	40
Boer (3)	0	0,0	8	20	0	0,0	40
Anglo-Nubiana(4)	2	7,69	6	23,1	13	50	26
Saanen (5)	1	2,77	16	44,44	1	2,78	36
S.Azul (6)	2	5	9	22,5	28	70	40
Moxotó (7)	4	10	9	22,5	26	65	40
Marota (8)	1	2,5	4	10	19	47,5	40
Canindé (9)	0	0,0	6	15	21	52,5	40
Repartida (10)	4	10	7	17,5	19	47,5	40
Graúna (11)	3	7,69	11	28,21	14	35,9	39
Murciana (12)	3	8,57	9	25,71	20	57,14	35
Mur.-Granadina (13)	4	20	5	25	15	75	20
Granadina (14)	0	0,0	15	42,86	3	8,57	35
Total/Média	25	5,48	140	27,45	182	37,1	511

4. DISCUSSÃO

As distâncias D_A de Nei (Nei et al., 1983) e *Reynolds* (Reynolds et al., 1983) empregadas neste estudo apresentaram resultados satisfatórios (Tabelas 1 e 2). Estas distâncias se aplicam a estudos de populações com curtos períodos de evolução, como demonstrado por Eding e Laval (1999). As distâncias observadas entre as populações estudadas, principalmente entre as nativas e espanholas, podem ser classificadas como um curto espaço de tempo, aproximadamente 500 anos, conforme indica a história de colonização do Brasil.

As distâncias genéticas apresentam propriedades de significado matemático e biológico. Matematicamente as distâncias podem cumprir uma função de propriedade de distâncias métrica ou semi-métrica (desigualdade triangular), calculadas mediante as frequências alélicas (Dias, 1998). A interpretação biológica das distâncias dependem do modelo de divergência utilizado, que estão diretamente relacionados ou não as forças que podem modificar as frequências alélicas das populações, sendo essas forças a mutação, migração, deriva genética e seleção. Di Rienzo et al. (1994) relatam que muitos algoritmos tem sido propostos para delinear os modelos de mutação e de geração da variabilidade, uma vez que os níveis de mutação entre marcadores são diferentes, além de problemas que podem estar relacionados às amplificações via PCR.

Não há um consenso sobre que medida de distância genética utilizar nos estudos de relação genética entre populações de animais domésticos. A utilização de mais de uma distância genética é aconselhável na prática, devendo-se examinar cada uma delas, observando as semelhanças e diferenças entre elas, para que se determine a melhor distância (Martínez, 2001) que permita conclusões razoáveis e se estas estão adequadas às informações “*a priori*”.

A construção das árvores das distâncias genéticas, a partir das matrizes das distâncias permitiu uma visualização gráfica das populações avaliadas. Foi possível observar nas Figuras 1 e 2 distintos agrupamentos entre as populações nativas, exóticas e espanholas, tanto quando se utilizou 23 como com os 13 microssatélites mais informativos, demonstrando topologia robusta, onde este último apresentou maior número de ramos sólidos quando representados pela distância de *Reynolds* (Figura 3B), quando comparado aos demais (Figura 1A e 1B).

A proximidade de algumas populações sugere a possibilidade de mistura entre estas, já que encontram-se próximas e em sistemas que permitem que se acasalam, como é o caso das pequenas distâncias observadas entre a população SRD com as nativas e exóticas eram

esperadas, uma vez que este rebanho forma um mosaico genético derivado da mistura de várias raças (Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

Apesar de ser recente a utilização de microssatélites a partir das frequências alélicas (Buchanan et al., 1994), os algoritmos são mais antigos, uma vez que estes já eram utilizados com dados bioquímicos. Pode-se afirmar que a bateria de marcadores usada neste trabalho se mostrou adequada quando se mantém apenas os microssatélites mais polimórficos, pois obteve-se resultados semelhantes àqueles realizados com grande quantidade de marcadores.

No presente trabalho, as populações apresentaram-se próximas, com 86 de *bootstrap*. Os resultados obtidos concordam com os obtidos por Menezes et al. (2006) estudando as populações caprinas nativas brasileiras, portuguesas e espanholas, que encontrado *bootstrap* acima de 50, para algumas populações locais. O *bootstrap* é um teste de confiança que pode ser usado em árvores de distância e consiste em simples reamostragem com reposição pseudo aleatória dos dados. Essa técnica revela a consistência interna dos dados e, quando apresenta baixo valor (<50), menor é a confiabilidade dos resultados (Russo et al., 2001). Chakraborty e Nei (1976 e 1977) estudaram o efeito de *bottleneck* nas distâncias genéticas, demonstraram que as distâncias aumentam rapidamente na presença desse fenômeno. Porém, Nei (1987) demonstrou que se o tamanho populacional retorna ao nível original, esse efeito desaparece gradualmente, ainda que exija longo tempo para desaparecer.

As correlações entre as medidas de distâncias D_A e *Reynolds* obtidas foram altas e significativas, tanto quando realizadas com 23 microssatélites como 13 microssatélites. Apesar da FAO (2001) recomendar a utilização de mais de 25 marcadores microssatélites em estudos de diversidade e caracterização genética de animais domésticos, nos países em desenvolvimento o custo para se realizar estes estudos torna-se oneroso. Diferente de países ricos, onde o fator econômico não é relevante. Esse estudo permite verificar que o uso de poucos microssatélites permite resultados satisfatórios e contribuem para minimizar custos e viabilizar mais estudos.

Nei et al. (1983) relatam que as correlações entre várias medidas são geralmente altas, principalmente quando aplicadas a populações de animais domésticos. Chikhi et al. (2004) utilizaram o teste de Mantel para testar a correlação entre distâncias genéticas e geográficas (origem dos indivíduos) em rebanhos bovinos Jersey, não encontraram diferenças significativas entre as distâncias.

Já Maudet et al. (2002a), utilizando o mesmo teste para correlacionar as distâncias genéticas e geográficas em seis rebanhos de bovinos nativos franceses obtiveram correlação

significativa apenas quando se introduzia na análise rebanho Holandês. Uma das explicações dadas pelos autores foi devido a este rebanho ser exótico e apresenta-se mais distante geográfica e geneticamente das demais raças.

O teste de Mantel vem sendo empregado para estudo de correlação entre as distâncias genéticas. Paiva (2005), ao estudar ovinos nativos e de raças comerciais também encontrou correlação positiva e significativa nas cinco distâncias genéticas avaliadas (D_A , D_C , F_{ST} , R_{ST} e D_{SW} $p < 0,001$) com esse teste. O autor relata que as três primeiras distâncias tiveram as maiores correlações pelo fato de se ajustarem ao modelo de alelos infinitos, bem como as duas últimas ao modelo passo a passo. Valiente (2007) também obteve correlações significativas entre as distâncias genéticas (D_A , D_S , D_C de Cavalli Sforza e F_{ST}), utilizando os mesmos procedimentos encontrados no presente trabalho.

Na literatura encontram-se estudos de diversidade ou estrutura genética de populações, onde cada autor utiliza a distância ou distâncias genéticas que ajustam-se melhor a realidade de seus dados, além da utilização destas com outras análises, como por exemplo, o método frequentista proposto por Paetkau et al. (1995) e também as análises bayesianas (Buchanan et al., 1994; Rannala e Moutain, 1997; Cornuet et al., 1999; Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003 Baudouin et al., 2004), os quais vêm ganhando espaço nos estudos de genética de população.

Muitos estudos têm demonstrado que o uso de microssatélites serve, além de construção de árvores ou dendrogramas e distâncias, também para identificar a população de origem de um indivíduo, como podem ser vistos em trabalhos de Maudet et al. (2002a) com *Capra ibex*; Maudet et al. (2002b) avaliando bovinos; Garcia et al. (2006) estudando amostras de presunto Ibérico, Dalvit et al. (2008) com ovinos da raça Alpina, Bertthouly et al. (2008) estudando aves asiáticas e europeias e a integridade de registros de raças (Farid et al., 2000). Assim, a utilização de métodos de designação de indivíduos pode ser útil nos estudos genéticos de populações, detecção de migrantes, mistura de raças em manejo de pragas de culturas e animais em risco de extinção (Paetkau et al., 1995; Cornuet et al., 1999; Maudet et al., 2002a), podem vir a ser utilizados em conjunto para uma avaliação mais precisa dos dados estudados.

Nos dados avaliados é notória a diferença de indivíduos classificados corretamente entre os métodos frequentista e bayesiano (Tabela 3 e 4 vs Tabela 5 e 7). O método proposto por Paetkau et al. (1995) promoveu maior proporção de indivíduos classificados à sua respectiva população de origem, quando comparados ao método proposto por Rannala e

Mountain (1997). Uma das vantagens deste último método é que as frequências nulas desaparecem, identificando possíveis genótipos imigrantes (Cornuet et al., 1999). Já as matrizes de distâncias promoveram apenas a classificação, quanto às relações de proximidades ou não das populações, sem discriminar quais indivíduos pertenciam ou não à determinada população. Apenas permitiram a construção de árvores de distâncias para visualização dos grupos.

Cornuet et al. (1999) observaram que o desempenho dos métodos (frequentistas, bayesianos e de três distâncias) para qualquer valor de F_{ST} foi o mesmo, porém, o melhor resultado se deu ao método bayesiano, mostrando-se mais eficiente, quando comparado aos demais. O uso do método bayesiano permitiu observar, que nas populações de caprinos locais, alguns indivíduos representam uma mistura, tanto da sua própria população como de outras. Ao contrário do teste de Paetkau et al. (1995), esse teste trabalha somente com simulação de indivíduos (genótipos simulados de frequências alélicas) (Maudet et al., 2002a). Já o teste de Cornuet et al. (1999) fornece um valor de P para medir a certeza de que cada indivíduo realmente pertença a uma dada população, podendo a população a que pertence o indivíduo estar sofrendo alguma outra introdução.

Foi possível verificar que alguns indivíduos, além de serem classificados à sua respectiva população, também compartilhavam genes com outras. Isso pode afetar o sucesso da classificação, assim como a presença de alelos nulos. Mesmo assim, Carlsson (2008) ressaltou que mesmo com uma baixa magnitude dos efeitos, os microssatélites podem ser utilizados para teste de designação com certo grau de confiança.

No presente trabalho obteve-se correta designação de indivíduos de 36,16% e 39,04% com 13 e 23 microssatélites (Tabelas 5 e 7), para o método bayesiano. Para o método frequentista esses valores foram de 82% e 85,3 (Tabelas 3 e 4), com 13 e 23 microssatélites, respectivamente.

Trabalhos como os de Farid et al. (2000) obtiveram mais de 90% de indivíduos corretamente alocados ao seu respectivo rebanho, ao trabalhar com 10 marcadores microssatélites em 10 populações ovinas e Berthouly et al.(2008) obtiveram designações de 93,7% e 96,8% utilizando 22 e 14 locos de microssatélites. Resultados semelhantes foram encontrados por Brito et al. (2003), trabalhando com bovinos nativos portugueses com 19 microssatélites. Já Maudet et al.(2002a) encontraram resultados similares, inferiores a 70%, com um valor de P de 0,05, diminuindo para 33% com valor de P de 0,001. E Maudet et al. (2002b) encontraram porcentagem de correta classificação de indivíduos de 30,5, 16,2 e 4,3%,

para diferentes valores de $P(0,05; 0,01 \text{ e } 0,001)$. Isso mostra que os diferentes níveis de *alpha* influenciam diretamente na precisão da designação (classificados) do indivíduo à população onde foi amostrado.

Em estudos dessa natureza é preferível usar um grande número de marcadores conforme recomenda a ISAG e FAO para estudos de diversidade. No entanto, os resultados aqui obtidos sugerem que o uso de poucos marcadores também pode gerar resultados aceitáveis, de forma a economizar tempo e recursos financeiros. Isso se aplica bem aos países em desenvolvimento onde os recursos para investigação são limitados, o que impede, muitas vezes, a realização do estudo. Mesmo em países desenvolvidos estudos, dessa natureza têm sido realizados com menos de vinte marcadores a exemplo de Cañon et al. (2001) e Jordana et al. (2003) com bovinos e Kusza et al. (2008) com ovinos.

5. CONCLUSÃO

As distâncias genéticas de Nei e de Reynolds permitiram estudar as relações genéticas entre as populações e, juntamente com os métodos de alocação de indivíduos, permitiram uma avaliação confiável dos rebanhos estudados.

A combinação de diferentes metodologias possibilitou resultados confiáveis.

Foi possível obter resultados semelhantes com o uso de poucos microssatélites, o que resulta em economia de tempo e dinheiro, fator primordial nos países onde os recursos para a pesquisa em geral são limitados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcochete, A. A. N. de. (2005). ***DIVERSIDADE GENÉTICA E MAPEAMENTO DE QTLs DO SISTEMA GÊNICO DE MACHO-ESTERILIDADE TERMOSENSÍVEL (TGMS) DO GENOMA DE ARROZ (Oryza sativa L.)***. Tese. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular. 157fls.

Arranz, J. J., Bayón, Y. & San Primitivo, F. (1996). Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics*. v. 27, pp.415-419.

Barker, J. S.F. (1994). A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 5th. *Proceedings...* Guelph, 1994. 21, pp. 501-508.

Baudouin, L., S. Piry y J. M. Cornuet. 2004. Analytical bayesian approach for assigning individuals to populations. *Journal of Heredity*. v. 95, pp. 217-224.

Berthouly, C.; Bed'Hom, B.; Tixier-Boichard, M.; Chen, C.F.; Lee, Y.P.; Laloë, D.; Legros, H.; Verrier, E.; Rognon, X. (2008). Using molecular markers and multivariate methods to study the genetics diversity of local European and Asian chicken breeds. *Animal Genetics*. v. 39, pp. 121-129.

Brito, N. V.; Arranz, J.J.; Bayón, Y.; Colaço, J.; San Primitivo, F. (2003). O método de inclusão, baseado em genótipos multilocos, na alocação de indivíduos de algumas raças bovinas autóctones do norte de Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. v. 98, n. 545, pp. 47-49.

Buchanan, F. C.; Adams, L. J.; Littlejohn, R. P. et al. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*. v. 22, pp. 397-403.

Cañón, J., Checa, M. L., Carleos, C., Vega-Pla, J. L., Vallejo, M. & Dunner, S. (2000). The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics*. v. 31, pp. 39-48.

Cañon, J.; Alexandrino, P.; Bessa, I.; Carleos, C.; Carretero, Y.; Dunner, S.; Ferrand, N.; Garcia, D.; Jordana, J.; Lloë, D.; Pereira, A.; Sanchez, A.; Moazami-Gourdarzi, K. (2001). Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet. Sel. Evol.* v.33, pp. 311-332.

Carlsson, J. (2008). Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity.* v. 99, n. 6. pp. 616-623.

Cavalli-Sforza, L. L. & Edwards, A. W. F. (1967). Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Evolution.* v. 21, pp. 550-570.

Cavalli-Sforza, L. L. (1969). Human diversity. *Proceedings of 12th. International Congress of Genetics.* Tokyo. 3, pp. 405-416.

Chakraborty, R. and M. Nei (1976) Hidden genetic variability within electromorphs in finite populations. *Genetics.* v. 84, pp. 385-393.

Chakraborty, R. and M. Nei (1977) Bottleneck effects on average heterozygosity and genetic distance with the stepwise mutation model. *Evolution.* v. 31, pp. 347-356.

Chikhi, L.; Goossens, B.; Treanor, A. and Bruford, M.W. (2004). Population genetic structure of and inbreeding in an insular cattle breed, the Jersey, and its implications for genetic resource management. *Heredity.* v. 92, pp. 396-401.

Cordeiro, G.M. (1992). *Introdução a teoria assintótica.* Rio de Janeiro: Instituto de Matemática Pura e Aplicada. 1999. 210 p.

Cornuet J. M.; Piry S.; Luikart G.; Estoup A.; Solignac M. 1999. New method employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics.* v. 153, n. 4, pp. 1989-2000.

Dalvit, C.; Saccà, E.; Cassandro, M.; Gervaso, M.; Patore, E.; Piasentie, E. (2008). Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Ruminant Research.* v. 80. pp. 45-51.

Dias, L. A. S. (1998). Análise multimensionais. In: Alfenas, A. A., *Eletroforese de isoenzimas: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa, Ed. UFV, 1998, pp. 381-404.

Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M. & Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. v. 91, pp. 3166-3170.

Eding, J.H.; Laval, G. (1999). Measuring the genetic uniqueness. In "**Livestock In Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources**" edited by Oldenbroek JK. DLO institute for Animal Science and Health (Lelystad, the Netherlands).

Estoup, A. e Angers, B. (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations. *Advance in Molecular Ecology*. Ed. By Gary R. Carvalho. p. 55-86.

Falush, D., M. Stephens y J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. v.164, pp. 1567-1587.

F.A.O. Segundo Documento de Líneas Directrices para la Elaboración de Planes Nacionales de Gestión de los Recursos Genéticos de Animales de Granja. Gestión de pequeñas poblaciones en peligro. (2001). FAO. Roma. 171 p. 2001.

Farid, A.; O' Reilly, E.; Dollard, E.; Kelsey Jr., C.R. (2000). Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science*. v. 80, n. 1, pp. 9-17.

García, D.; Martínez, A.M.; Dunner, S.; Vega-Pla, J. L.; Fernandez, C.; Delgado, J. V.; Cañon, J. (2006). Estimation of the genetic admixture composition of Iberian dry-cured ham samples using DNA multilocus genotypes. *Meat Science*. v. 72. pp. 560 – 566.

Gusmão, F. R. S. de. (2008). **UMA ABORDAGEM BAYESIANA PARA DISTRIBUIÇÃO WEIBULL INVERSA GENERALIZADA**. Dissertação. UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO, PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMETRIA E ESTATÍSTICA APLICADA. 71 fls.

Jordana, J.; Alexandrino, P.; Beja-Pereira, A.; Bessa, I.; Cañon, J.; Carretero, Y.; Dunner, S.; Laloë, D.; Moazami-Goudarzi, K.; Sanchez, A.; Ferrand, N. (2003). Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *J. Anim. Breed. Genet.* v. 120, pp. 73–87.

Karp, A.; Kresovich, S.; Bhat, K.V.; Ayad, W.G.; Hodgkin, T. (1997a). **Molecular tools in plant genetic resources conservation**. A guide to the technologies. IPGRI, Rome.

Karp, A.; Edwards, K.J.; Bruford, M.; Funk, S.; Vosman, B.; Morgante, M.; Seberg, O.; Kremer, A.; Boursou, T. P.; Arctander, P.; Tautz, D.; Hewitt, G.M. (1997b). Molecular technologies for biodiversity evaluation opportunities and challenges. *Nature Biotechnology*. p. 15625-15628.

Kusza, S.; Nagy, I.; Sasvári, Z.; Stágel, A.; Németh, T.; Molnár, A.; Kume, K.; Bősze, Z.; Jávör, A.; Kukovics, S. (2008). Genetic diversity and population structure of Tsigai and Zackel type of sheep breeds in the Central-, Eastern- and Southern-European regions. *Small Ruminant Research*. v. 78. pp. 13–23.

Laval, G., Iannuccelli, N., Legault, C., Milan, D., Groenen, M., Giuffra, E., Andersson, L., Nissen, P., Jorgensen, C., Beeckmann, P., Geldermann, H., Foulley, J. L., Chevalet, C.; Ollivier, L. (2000). Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetic Selection Evolution*. **32**, pp. 187-203.

Laval, G.; Sancristobal, M.; Chevalet, C. (2002). Measuring genetic distances between breeds: use of some distances in various short term evolution models. *Genet. Sel. Evol.* v. 34, pp.481-507.

Li, K., Chen, Y., Moran, C., Fan, B., Zhao, S. & Peng, Z. (2000). Analysis of diversity and genetic relationships between four Chinese indigenous pig breeds and one Australian commercial pig breed. *Animal Genetics*. v. 31, pp. 322-325.

Martínez, A. (2001). *Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Maudet, C. ; Luikart, G.; Taberlet, P. (2002a). Genetic diversity and assignment test among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J. Anim. Sci.* v. 80. pp. 942-950.

Maudet, C. ; Luikart, G.; Taberlet, P. (2002a). Genetic diversity and assignment test among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J. Anim. Sci.* v. 80. pp. 942-950.

Maudet, C. ; Miller, C.; Bassano, B.; Breitenmoser-Würsten, C.; Gauthier, D.; Obexer-Ruff, G.; Michallet, J.; Taberlet, P.; Luikart, G. (2002b). Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex (*Capra ibex (ibex)*). *Mol. Ecol.* v. 11, pp. 421-436.

Menezes, M. P. C.; Martinez, A. M.; Ribeiro, M. N.; Filho, E. C. P.; Bermejo, J. V. D. (2006). Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *R. Bras. Zootec.* v.35, n.4, pp.1336-1341.

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*. v. 106, pp. 283-282.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. v. 70, pp. 3321-3323.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. v. 89, pp. 583-592.

Nei, M., F. Tajima; Y. Taten. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*. v. 19, pp. 153-170.

Nei, M. (1987). Genetic distance molecular phylogeny. In: *Population Genetics and Fishery Management* (N. Ryman and F. Utter, eds.), University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 193-223.

Nei, M.; S. Kumar. (2000). **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press. Capítulo 3. Oxford.

Oliveira, J.C.V. de; Rocha, L.L. da; Ribeiro, M.N. and Gomes Filho, M.A. (2006). Caracterização e perfil genético visível de caprinos nativos no Estado de Pernambuco. *Arch. Zootec.* 55 (209), pp. 63-73.

Oliveira, J. D. de; Igarashi, M. L. S de P.; Machado, T. M. M.; Miretti, M. M.; Ferro, J. A.; Contel, E. P.B. (2007). Structure and genetic relationships between Brazilian naturalized and exotic purebred goats domestic goat (*Capra hircus*) breeds on microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. v. 30, n. 2, pp. 356-363.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*. v. 4, pp. 347-354.

Paiva, S. R. (2005). *Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares*. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento. 118p.

Paulino, C. D.; Turkman, M. A. A.; Murteira, B. (2003). *Estatística bayesiana*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, 446 p.

Pritchard, J. K.; Stephens, M. e Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. v. 155, pp. 945-959.

Piry, S.; Alapetite, A.; Cornuet, J-M.; Paetkau, D.; Baudouin, L.; Estoup, A. (2004). GENECLASS 2: A Software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*. v. 95, n. 6, pp. 536-539.

Rannala, B.; J. L. Mountain. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. In: *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, USA. p. 9197-9221.

Reynolds, J., Weir B. S.; Cockerham, C.(1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics Society of America*. v. 105, pp. 767-779.

Russo, C. A. M.; Miyaki, C. Y.; Pereira, S.L. (2001). Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. In: Matioli, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos (ed), 2001, 202 p.

SAS Institute. (2001). SAS/STAT User's guide Release 8.02. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Saitou, N. e Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* V. 4, pp. 406-425.

Schneider, H. (2007). *Métodos de análise filogenética. Um guia prático*. 3 ed. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética. 200p.

Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical taxonomy*. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.

Takezaki, N.; Nei, M. (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA, *Genetics*. v.144, n. 38, p. 999.

Valiente, J. Q. (2007). *Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas*. Tese. 2007. 155fls. Universidade de Córdoba – Departamento de Genética. Espanha.

ANEXO

Quadro 1 referente ao número de alelos (Na), heterozigidade observada, equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada marcador em cada população e Quadro 2 ao conteúdo de informação polimórfico (PIC).

Quadro 1

Locos	Na	H_o													
		SRD	ALP	BOER	ANG	SAAN	AZUL	MOX	MARO	CANIN	REPAR	GRAU	MUR	MG	GRAN
BM1329	12	0,681	0,766*	0,530	0,610	0,639	0,748	0,632	0,688	0,787	0,624	0,805	0,764	0,759	0,737
BM6506	10	0,721	0,809	0,540	0,549	0,803	0,121	0,232	0,537	0,491	0,568	0,380	0,788	0,830	0,701
BM8125	08	0,730	0,775	0,540	0,623	0,757	0,775	0,711	0,714	0,742	0,670	0,752	0,698	0,815	0,783
BM1818	10	0,769*	0,794	0,314	0,476	0,736*	0,688	0,782	0,496	0,807	0,796	0,703	0,793	0,837*	0,794
CSR247	10	0,799	0,600	0,565	0,810	0,731	0,567*	0,752	0,681	0,774	0,779	0,519	0,757*	0,743	0,597
HSC	17	0,857*	0,800*	0,782	0,786*	0,833	0,745*	0,684*	0,823	0,731	0,807	0,777	0,864	0,814	0,858
MM12	16	0,833	0,877	0,778	0,588	0,884	0,663	0,807*	0,663	0,724	0,830	0,727	0,621	0,771	0,888
OarFCB48	09	0,758	0,805*	0,548	0,676	0,794	0,495	0,582	0,653*	0,599	0,601	0,550	0,850	0,821	0,830
SRCRSP8	12	0,814	0,749*	0,706	0,739*	0,665	0,671	0,736*	0,722	0,729	0,808	0,709*	0,694	0,756	0,718
INRA63	06	0,551	0,635	0,725	0,678	0,626*	0,565	0,555	0,544	0,552*	0,469	0,651	0,728*	0,734*	0,645
MAF209	03	0,167	0,073	0,611*	0,381	0,081	0	0	0,025	0,074	0,120*	0,025	0,268	0,261*	0,084
ILSTS011	09	0,713*	0,824	0,693	0,564	0,779*	0,561	0,701*	0,507	0,644*	0,757	0,550	0,673	0,614	0,766
SPS115	06	0,603*	0,572	0,459	0,495	0,286	0,406	0,398*	0,505	0,540	0,550*	0,483	0,364*	0,367	0,352
TGLA122	12	0,864*	0,814	0,572	0,672	0,769	0,676	0,815	0,822	0,792	0,8	0,764	0,646	0,724	0,648
BM6526	17	0,767	0,835	0,809	0,751	0,830	0,686*	0,667	0,813	0,601	0,707	0,772	0,508	0,670*	0,807
CSR60	10	0,757	0,844	0,666	0,782	0,767	0,712	0,749	0,770*	0,713*	0,713	0,781	0,799	0,819	0,836*
CSSM66	29	0,823*	0,906*	0,719*	0,824	0,882*	0,654	0,647	0,811	0,729	0,856	0,751*	0,867*	0,824*	0,834*
McM527	09	0,772	0,812	0,647	0,700	0,426	0,552	0,710*	0,551	0,680	0,714*	0,688	0,631	0,657	0,703
OarFCB11	15	0,790	0,724*	0,792*	0,610	0,705	0,594	0,739*	0,446	0,804	0,567	0,659	0,797	0,712	0,800
OarFCB304	18	0,842	0,827	0,542*	0,611	0,779*	0,846	0,688	0,619*	0,792*	0,756	0,845	0,819	0,709*	0,802
MAF65	10	0,830*	0,798*	0,618	0,723	0,738	0,692*	0,669*	0,559*	0,759*	0,733	0,717*	0,807	0,887*	0,815
ETH225	04	0,221	0,361	0,542	0,460	0,137	0,530	0,483	0,460	0,366	0,444*	0,581	0,339	0,229	0,189
ETH10	06	0,657	0,647	0,645	0,510	0,672	0,296	0,585	0,576	0,616	0,580*	0,618	0,493	0,548*	0,593

* Marcadores em desequilíbrio para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$)

Quadro 2

Locos	<i>PIC</i>													
	SRD	ALP	BOER	ANG	SAAN	AZUL	MOX	MARO	CANIN	REPAR	GRAU	MUR	MG	GRAN
BM1329	0,6313	0,720	0,410	0,532	0,600	0,693	0,552	0,612	0,741	0,566	0,764	0,710	0,696	0,690
BM6506	0,665	0,768	0,473	0,508	0,760	0,118	0,222	0,468	0,460	0,534	0,360	0,747	0,787	0,653
BM8125	0,684	0,729	0,496	0,587	0,704	0,729	0,645	0,657	0,690	0,613	0,703	0,661	0,769	0,741
BM1818	0,735	0,754	0,299	0,440	0,679	0,646	0,741	0,470	0,767	0,758	0,671	0,752	0,791	0,751
CSR247	0,759	0,558	0,465	0,765	0,685	0,533	0,703	0,626	0,736	0,735	0,500	0,708	0,681	0,551
HSC	0,822	0,752	0,748	0,736	0,800	0,695	0,635	0,787	0,681	0,769	0,725	0,835	0,760	0,828
MM12	0,799	0,852	0,733	0,506	0,858	0,615	0,769	0,620	0,682	0,796	0,676	0,592	0,726	0,863
OarFCB48	0,710	0,767	0,497	0,603	0,753	0,443	0,496	0,590	0,520	0,560	0,504	0,817	0,773	0,792
SRCRSP8	0,778	0,698	0,646	0,676	0,600	0,605	0,684	0,665	0,682	0,770	0,649	0,637	0,688	0,674
INRA63	0,461	0,571	0,668	0,611	0,544	0,468	0,452	0,456	0,443	0,402	0,580	0,673	0,667	0,572
MAF209	0,155	0,069	0,536	0,317	0,076	0	0	0,024	0,071	0,115	0,025	0,229	0,222	0,080
ILSTS011	0,645	0,789	0,634	0,468	0,742	0,500	0,641	0,435	0,590	0,707	0,505	0,609	0,528	0,725
SPS115	0,508	0,482	0,398	0,436	0,249	0,330	0,325	0,374	0,425	0,440	0,385	0,331	0,310	0,303
TGLA122	0,837	0,779	0,471	0,610	0,726	0,635	0,780	0,788	0,751	0,764	0,715	0,603	0,665	0,591
BM6526	0,739	0,804	0,776	0,696	0,798	0,625	0,627	0,780	0,570	0,671	0,736	0,456	0,626	0,775
CSRM60	0,703	0,811	0,614	0,729	0,719	0,648	0,697	0,724	0,674	0,665	0,740	0,756	0,767	0,801
CSSM66	0,790	0,885	0,660	0,779	0,858	0,622	0,601	0,773	0,680	0,827	0,724	0,839	0,780	0,798
McM527	0,724	0,773	0,575	0,622	0,402	0,485	0,645	0,503	0,614	0,656	0,642	0,565	0,573	0,648
OarFCB11	0,748	0,672	0,750	0,518	0,656	0,503	0,683	0,404	0,764	0,521	0,586	0,759	0,665	0,759
OarFCB304	0,818	0,795	0,445	0,567	0,734	0,816	0,643	0,581	0,751	0,728	0,815	0,783	0,638	0,771
MAF65	0,796	0,755	0,545	0,668	0,695	0,629	0,600	0,469	0,717	0,676	0,658	0,771	0,851	0,778
ETH225	0,194	0,327	0,451	0,365	0,130	0,410	0,374	0,351	0,296	0,342	0,487	0,301	0,207	0,180
ETH10	0,576	0,562	0,561	0,422	0,593	0,275	0,513	0,506	0,535	0,514	0,541	0,393	0,435	0,494