

Universidade Federal do Piauí

Caracterização genética de caprinos Gurguéia no Estado do Piauí

Sammya Vanessa Pereira de Almeida Maciel

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

**Teresina – PI
2011**

**Sammya Vanessa Pereira de Almeida Maciel
Bióloga**

**Caracterização genética de caprinos Gurguéia no Estado do
Piauí**

Orientador: Prof. Dr. José Lindenberg Rocha
Sarmiento - UFPI
Coorientador: Pesq. Dr. Paulo Sarmanho da
Costa Lima-EMBRAPA
Coorientador: Pesq. Dr^a. Adriana Mello de Araújo
- EMBRAPA

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Piauí como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Genética
e Melhoramento, área de concentração em
Genética e Melhoramento, para obtenção do
título de “Mestre”.**

**Teresina – PI
2011**

Caracterização genética de caprinos Gurguéia no Estado do Piauí

Sammya Vanessa Pereira de Almeida Maciel

Aprovada em: ____ / ____ / ____

Comissão julgadora:

Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento - Orientador
Universidade Federal do Piauí

Pesq. Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima – Co-orientador
Embrapa Meio-Norte

Pesq. Dr. Fábio Mendonça Diniz – Membro titular
Embrapa Meio-Norte

Prof. Dr. José Elivalto Guimarães Campelo – Membro titular
Universidade Federal do Piauí

Dedico à minha filha Ana Bárbara.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda graça recebida e por permitir mais esta conquista;

À Universidade Federal do Piauí, em especial, ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento;

À Embrapa Meio-Norte por disponibilizar seu Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular para a realização desta pesquisa;

Ao Banco do Nordeste pelo financiamento do projeto;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Dr. Lindenberg Rocha Sarmento, pela orientação;

Ao Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, por estar sempre à disposição para ajudar durante a execução do projeto e pela amizade conquistada ao longo de seis anos de ensinamentos;

À Dr. Adriana Mello Araújo, por confiar a mim a execução do seu projeto;

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento por conduzir tão bem as disciplinas;

Ao colega Márcio pelo auxílio nas coletas e momentos de descontração;

Ao Ozires por se mostrar sempre pronto a ajudar nas coletas;

Aos criadores e às pessoas que nos acompanharam e intermediaram nas coletas de dados;

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, em especial, Cíntia, Geice, Ísis, Michelli e Ricardo pelas conversas tão esclarecedoras e ajuda no laboratório;

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento;

Ao meu querido esposo Felipe pelo amor, paciência, compreensão e apoio;

À minha mãe, por tudo, especialmente por cuidar tão bem da minha Aninha;

Aos demais familiares pelo apoio e torcida sempre presentes;

A todos que tornaram possível a realização deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISAO DE LITERATURA.....	12
2.1 Caprinos do Nordeste	12
2.2 Conservação de Recursos Genéticos	16
2.3 Marcadores Moleculares.....	17
2.4 Análises Estatísticas.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Amostras.....	26
3.2 Extração do DNA.....	28
3.3 Otimização dos <i>primers</i>	28
3.4 Análises estatística.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5 CONCLUSÕES	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

SAMMYA VANESSA PEREIRA DE ALMEIDA MACIEL. **Caracterização Genética de Caprinos Gurguéia no Estado do Piauí**. 2011. 50 paginas. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2011.

Os caprinos naturalizados do nordeste são originários de animais trazidos para o Brasil na época da colonização e que passaram por um longo processo de adaptação às condições do semi-árido. Atualmente, estes animais estão em risco de desaparecimento em consequência do cruzamento desordenado com raças especializadas. O ecótipo Gurguéia é citado na literatura como vivente da região do Vale do Rio Gurguéia, na região Sul do Estado do Piauí, e não são conservados por nenhuma instituição de pesquisa, estando sob risco de desaparecimento. A caracterização genética é um passo importante no processo de conservação de recursos genéticos. Neste trabalho realizou-se a caracterização genética de animais com padrão racial Gurguéia, utilizando-se análise molecular do DNA de animais amostrados, no Estado do Piauí. Foram otimizados 10 *loci* de microssatélites previamente citados na literatura. Todos os *loci* de microssatélites analisados apresentaram polimorfismo. Foi amplificando um total de 104 alelos. O valor médio da heterozigosidade observada (0,775) foi menor que o da esperada (0,851). O valor médio do Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi de 0,825, o que sugere o alto poder discriminativo dos marcadores. Foram observados desvios significativos do Equilíbrio de Hardy- Weinberg para quase todos os *loci*. A análise molecular de variância indica que há maior variabilidade dentro das populações do que entre as populações. Estes resultados mostram que há indicativos de diversidade nos rebanhos, apesar de considerável perda de heterozigosidade.

Palavras-chave: Conservação de recursos genéticos, diversidade genética, microssatélites

ABSTRACT

SAMMYA VANESSA PEREIRA DE ALMEIDA MACIEL. **Genetic Characterization of Local Gurgueia Goats Breed in Piauí State, Brazil**. 2011. 50 páginas. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 2011.

Genetic Characterization of Local Gurgueia Goats Breed in Piauí State, Brazil

The Northeast local breeds of goats are originating from animals introduced in Brazil during European colonization and which were submitted to a long process of adaptation to the local semiarid climatic conditions. Nowadays, the local breeds are endangered due to successive crosses with specialized breeds. The Gurgueia ecotype is cited in literature as living in Valley of Gurgueia River, located in South region of Piauí. There is no conservation plan conducted by any research institution, while the Gurgueia risk of endangerment is unknown. Genetic characterization is an important step to genetic resource conservation. In this research, animals phenotypically distinguished as Gurgueia breed in Piauí State were used to genetic characterization through DNA marks analysis. 10 microsatellites loci previously cited in literature were submitted to PCR optimization. All loci showed polymorphism. A total of 104 alleles were amplified. The means of observed heterozygosity (0.775) was lower than the expected heterozygosity (0.851). The Polymorphic Information Content (PIC) was 0.825, indicating the height discrimination power of the used markers. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were observed in almost all loci. Molecular analysis of variance showed more variability within herds than between herds. The results revealed that there is considerable diversity within herd, despite the loss of heterozygosity.

Key-words: Genetic resources conservation, genetic diversity, DNA microsatellites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Caprinos naturalizados encontrados no Estado do Piauí: a) Moxotó; b) Canindé; c) Marota; d) Repartida, Teresina – Piauí, 2011.....14
- Figura 2 – Comparação entre o ecótipo Gurguéia e seu possível ancestral a raça Parda Alpina. a) Gurguéia e b) Parda Alpina, Teresina – Piauí, 2011.....15
- Figura 3 – Mapa do Piauí com os municípios onde foram realizadas coletas em destaque, Teresina – Piauí, 2011.....27
- Figura 4 – Cartão FTA impregnado com amostras de sangue de caprinos Gurguéia, perfurador e esteira de apoio, Teresina – Piauí, 2011.....28
- Figura 5 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida mostrando os dez marcadores microssatélites otimizados para caprinos do ecótipo Gurguéia. M: Marcador 10 pb., Teresina – Piauí, 2011.....32
- Figura 6 – Dendrograma construído pelo método UPGMA, mostrando a relação entre as populações estudadas, Teresina – Piauí, 2011.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efetivo de caprinos na região Nordeste do Brasil no ano de 2009, Teresina – Piauí, 2011.....	13
Tabela 2 – Municípios onde foram coletadas amostras de sangue de animais com características do ecótipo Gurguéia com as respectivas coordenadas e número de indivíduos coletados, Teresina – Piauí, 2011.....	26
Tabela 3 – Descrição dos primers de microssatélites utilizados no estudo da Caracterização genética de caprinos Gurguéia naturalizados, Teresina – Piauí, 2011.....	30
Tabela 4 Condições de otimização dos <i>loci</i> de microssatélites utilizando a técnica PCR para amplificação do DNA de caprinos do ecótipo Gurguéia, Teresina – Piauí, 2011.....	33
Tabela 5 - Diversidade genética das populações de caprinos Gurguéia no Estado do Piauí. N, número de alelos; H _O , heterozigiosidade observada; H _E , heterozigiosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica; F _{IS} , índice de fixação de subpopulações; F _{IT} , índice de fixação da população total; F _{ST} , índice de fixação da subpopulações dentro da população total, Teresina – Piauí, 2011.,.....	35
Tabela 6 – AMOVA – Análise de Variância Molecular, Teresina – Piauí, 2011.....	37
Tabela 7 – Matriz de distância das populações estudadas. 1, Acauã; 2, Queimada Nova; 3, São Raimundo Nonato, 4, Jurema; 5, Dom Inocêncio; 6, Colônia do Piauí e 7, Oeiras, Teresina – Piauí, 2011.....	37

1 INTRODUÇÃO

A população de caprinos é de aproximadamente 807 milhões de cabeças, sendo os maiores detentores de rebanho a China, a Índia e o Paquistão que, conjuntamente, concentram em torno de 46,1% do rebanho do mundo. O Brasil tem aproximadamente 9,2 milhões de animais e é o 9º maior produtor mundial, sendo que cerca de 90% do rebanho nacional concentra-se na região Nordeste do país (IBGE, 2009).

Os caprinos do Nordeste do Brasil são grupamentos genéticos descendentes de animais trazidos para o Brasil na época da colonização e que passaram por um longo período de seleção natural e adaptação, principalmente, ao semi-árido. Atualmente, estes animais como grupo genético, se encontram em risco de desaparecimento em consequência da introdução e cruzamento desordenado com raças introduzidas mais recentemente, como sendo mais produtivas.

Em 1991 a FAO (*Food and Agriculture Organization*) iniciou um levantamento a nível mundial sobre a situação das principais espécies de animais domésticos. A importância deste trabalho é vista ao se considerar a afirmação de Groeneveld et al. (2010), a respeito de gestão eficaz dos recursos genéticos animais exigir um conhecimento abrangente das características das raças, incluindo dados sobre a dimensão e estrutura da população, distribuição geográfica, o ambiente de produção e a diversidade genética dentro e entre as raças.

A importância de se medir a variabilidade genética dos animais é inegável, pois segundo Gama (2004), a conservação dos recursos genéticos está efetivamente relacionada à manutenção da variabilidade inter-racial, evitando a extinção de raça e intra-racial evitando a erosão genética.

Oliveira (2007) chama a atenção para o fato de muitos países considerarem prioridade a conservação de seus recursos genéticos, e, que no Brasil não deveria ser diferente, pois se trata do País com a maior biodiversidade do planeta, porém, tem ocorrido grande perda de material genético, o que coloca a conservação genética como necessidade de urgência.

A classificação quanto à situação de risco de extinção de uma raça, segundo a FAO (2004), é dividida em seis categorias: extinto, crítico, em extinção, em extinção-mantido, não há risco e apresenta-se sob risco desconhecido. Nesta classificação é usado como referência o tamanho da população, o número de fêmeas do rebanho e a tendência de crescimento da população.

Costa (2010), ao realizar o inventário e estudo de caracterização genética através de marcadores morfológicos, constatou que os caprinos do ecótipo Gurguéia encontram-se em risco crítico de extinção.

Segundo relatos de Medeiros et al. (1994), o ecótipo Gurguéia tem sua origem em animais vindos da Europa, que introduzidos no Brasil, se deslocaram até o vale do Rio Gurguéia na região Sul do Estado do Piauí, onde passaram por processo de adaptação, resultando no padrão fenotípico distinto. Em virtude da semelhança fenotípica com a raça Parda Alpina, acredita-se que este ecótipo seja descendente dela.

Em 2004, a FAO propôs um programa integrado para a gestão global dos recursos genéticos, o projeto MODAD (*Measurement of Domestic Animal Diversity*), utilizando a metodologia de microssatélites para a caracterização de raças. Segundo Menezes (2009), a caracterização genética com o uso de marcadores moleculares constitui-se uma ferramenta eficaz para quantificação da diversidade genética de animais domésticos.

Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites, também denominados STRs (*Short Tandem Repeats*) ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) têm sido freqüentemente utilizados em estudos de caracterização genética. Estes marcadores consistem em pequenos fragmentos repetitivos abundantes no genoma eucariótico que exibem repetições em série de dois a seis pares de bases (TAUTZ, 1989). Tais variações no número de unidades repetidas traduzem-se num elevado grau de polimorfismo (MENOTTI-RAYMOND e O'BRIEN, 1995).

O presente estudo teve como objetivo a otimização de um painel de 10 *primers* de microssatélites recomendados pela FAO (2004) para caracterização da variabilidade genética de caprinos e, a partir destes, realizar a caracterização genética de caprinos do ecótipo Gurguéia encontrados no Estado do Piauí.

Esta Dissertação é composta das partes: Resumo, Introdução, Revisão de Literatura, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão, Considerações Finais e Referências Bibliográficas que foram elaboradas seguindo as Normas estabelecidas pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinos do Nordeste

A espécie *Capra hircus* (LINNAEUS, 1758) pertence à família Bovidae. Dentro da família Bovidae, cabras e ovelhas compõem a tribo Caprini que inclui seis espécies de cabras, seis de ovelhas e cinco espécies relacionadas.

A presença da espécie caprina no Brasil foi registrada no início da exploração mineira por volta de 1515-1540 (SIMONSEN, 1937). Oliveira et al. (2006) mencionam que os primeiros animais domésticos a chegarem junto com os colonizadores foram os eqüinos e asnos, caprinos e galinhas. Os primeiros devido a sua capacidade de trabalho e os dois últimos devido ao pequeno porte facilitado serem transportados nos navios e destinados à alimentação da tripulação.

Os animais introduzidos neste período eram provenientes de grupos genéticos portugueses e espanhóis (FIGUEIREDO et al., 1987), sendo que somente no século XX têm se relatos da entrada de animais já com padrão racial definido (MACHADO, 1995), oriundos da África, Ásia e Europa. Durante o período colonial, os caprinos passaram por processo seletivo imposto por manejo do homem e pelas condições naturais do Nordeste brasileiro, portanto um rigoroso processo de naturalização. Entretanto, o ambiente hostil, especialmente no semi-árido, com longa estação seca, forçou a busca por um padrão específico para os caprinos o que implicou na diminuição do desempenho produtivo dos animais, mas deu origem às raças naturalizadas.

Assim, a introdução de animais exóticos através da importação ocorreu na tentativa de melhorar o desempenho do caprino naturalizado (LÔBO et al., 2010).

O Brasil se destaca na América do sul como um dos principais criadores de pequenos ruminantes. Segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal realizada pelo IBGE em 2009, o efetivo caprino do país é de aproximadamente 9,2 milhões de animais. Mais de 90% dos caprinos concentram-se na região Nordeste, sendo o Estado do Piauí o terceiro maior rebanho nacional com 1.389.384 animais, superado apenas pela Bahia e Pernambuco (Tabela 1).

No Brasil, os objetivos de exploração de caprinos estão direcionados à pele, carne e produção de leite. Apesar da baixa expressão em termos quantitativos, a exploração do caprino tem importância sócio-econômica para geração de emprego e renda no Brasil (LÔBO et al., 2010).

Tabela - Efetivo de caprinos na região Nordeste do Brasil no ano de 2009, Teresina – Piauí, 2011.

Estados	Número de animais	%
Bahia	2.768.286	33,34
Pernambuco	1.638.514	19,73
Piauí	1.389.384	16,74
Ceará	1.015.927	12,24
Paraíba	624.205	7,52
Rio Grande do Norte	398.679	4,80
Maranhão	385.666	4,64
Alagoas	62.530	0,75
Sergipe	19.643	0,24
Nordeste	8.302.834	100

Fonte: IBGE 2009

Nas duas últimas décadas, foi constatado que o uso e a conservação dos recursos genéticos animais são relativamente inseparáveis. Com o auxílio de várias organizações e de diversos países incluindo o Brasil, em 1991 a FAO iniciou um levantamento a nível mundial sobre a situação das principais espécies de animais domésticos do planeta. Desde então, programas mundiais de conservação têm sido implantados, em resposta à preocupação com a perda da diversidade genética causada pela extinção de raças e de populações (EGITO, MARIANTE e ALBUQUERQUE, 2002).

O Sistema Internacional para a Diversidade dos Animais Domésticos/DAD-IS (<http://dad.fao.org/>), mantido pela FAO, informa que o Brasil tem 21 raças de caprinos entre naturalizadas e exóticas. Segundo Costa (2010), a maioria não apresentando informações básicas, como a descrição do padrão fenotípico, o número de indivíduos e a aptidão produtiva, como é o caso da Gurguéia.

Moxotó, Marota, Canindé, Gurguéia e Repartida são exemplos de grupos genéticos encontrados no Estado do Piauí (MACHADO, CHAKIR e LAUVERGNE, 2000). São consideradas raças apenas a Moxotó e Canindé com homologação no Livro de Registro do Ministério da Agricultura em 1977 e 1999, respectivamente, portanto, os demais grupos caprinos são considerados ecótipos.

Os animais do ecótipo Repartida (Figura 1a) apresentam pelagem baia na parte anterior do corpo e prata na posterior, com delimitação irregular. Apresentam pêlos pretos nos quartos posteriores, nas coxas e nas pernas. A cauda é preta na parte dorsal e clara nos bordos. A exemplo da raça Moxotó, a aptidão dos caprinos Repartida é para pele e carne (RIBEIRO, 2006).



Fonte: SEBRAE

Figura : Caprinos naturalizados encontrados no Estado do Piauí. a) Repartida; b) Moxotó; c) Canindé e d) Marota, Teresina – Piauí, 2011.

A raça Moxotó (Figura 1b) recebeu esta denominação por ter sido observada no vale do Rio Moxotó no Estado de Pernambuco, embora ainda haja controvérsias sobre sua verdadeira origem. A Moxotó é uma cabra rústica e prolífica, 40% de seus partos são duplos. A prolificidade média é de 1,20 e a mortalidade para animais até um ano é de 32,9%. O peso médio de animais com um ano de idade é 15 quilos. Os animais desse grupo apresentam pelagem mais uniforme em relação às outras raças nativas (EMBRAPA, 2003).

A raça Canindé (Figura 1c), que possivelmente originou-se às margens do Rio Canindé, apresenta-se com cor preta e porção ventral do corpo avermelhada, ocasionalmente com a face amarela ou amarronzada; apresenta pêlos curtos, tamanho médio, sendo que fêmeas adultas pesam em torno de 30 a 40 quilos (FIGUEIREDO et al., 1987). A prolificidade varia de 1,29 a 1,43, e a mortalidade situa-se de 15% a 18,6% para animais de até um ano de idade. Para animais com essa idade o peso gira em torno de 15,7 kg.

O ecótipo Marota, também chamada Curaça (Figura 1d), é uma cabra de pelagem branca diferente dos outros tipos nativos também por apresentar pêlos mais longos, se assemelhando às raças europeias Saanen ou Angora (FIGUEIREDO et al., 1987) e orelhas eretas. Estudos com indivíduos Marota indicam variações de prolificidade de 1,3 a 1,53, embora animais até um ano de idade possam alcançar mortalidade média de 28,7%. Ao completar o primeiro ano de vida, atingem cerca de 17 Kg (ALMEIDA, 2007).

O ecótipo Gurguéia (Foto 2a) tem como provável origem a região do Vale do rio Gurguéia, no Sul do Estado do Piauí. Estes caprinos caracterizam-se por apresentar pêlo vermelho, o dorso, ventre e extremidades pretas, orelhas eretas e chanfro retilíneo. Essas características se assemelham à raça Parda Alpina (Figura 2) (MEDEIROS, GIRÃO e GIRÃO, 1987), assim, o ecótipo Gurguéia pode ser descendente dos caprinos do tronco alpino.



Fonte: SEBRAE

Figura : Comparação entre o ecótipo Gurguéia e seu possível ancestral a raça Parda Alpina. a) Gurguéia e b) Parda Alpina, Teresina – Piauí, 2011.

Informações sobre o ecótipo Gurguéia no Piauí são raras. Merece citação o trabalho de Costa (2010), que consiste de um inventário dos caprinos Gurguéia encontrados no Estado do Piauí e o trabalho desenvolvido por Pimentel et al. (1991), envolvendo cruzamento de animais Gurguéia pertencentes à Embrapa Meio-Norte com reprodutor da raça Parda-Alemã, tendo como objetivo principal a melhoria da qualidade leiteira, porém que se adaptassem às condições edafoclimáticas da região. Os resultados obtidos por Pimentel et al. (1991) indicaram taxa de parição

média de 72,6%, prolificidade de 1,49 e produção de leite com média diária de 0,390 litros/cabra.

Embora a EMBRAPA tenha implantado um programa de cruzamento utilizando o ecótipo Gurguéia na década de 90, não chegou até os criadores, uma vez que os resultados ficaram apenas em nível experimental.

Segundo Medeiros, Girão e Girão (1987), a importância dos caprinos Gurguéia como produtor de alimento para a região Nordeste é evidente, uma vez que este tipo caprino é criado para produção de carne, e considerando-se a sua rusticidade e adaptação ao regime de pasto a que é submetido.

Atualmente, o ecótipo Gurguéia encontra-se em risco de desaparecimento devido a exposição à cruzamentos sem controle com animais sem raça definida e, também, com raças exóticas para obtenção de rebanhos com melhores índices zootécnicos (COSTA, 2010). Dentre os caprinos naturalizados encontrados no Piauí, apenas Marota e Azul são conservados *in situ* pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CPAMN, no rebanho de conservação localizado no município de Castelo do Piauí. Animais Nambi também passaram a receber atenção desta instituição nos últimos cinco anos, sendo que está em processo de implantação um rebanho com esses animais em São João do Piauí-PI.

A esse respeito, no levantamento realizado por Costa (2010) para localização de Gurguéia no Estado do Piauí, não foi encontrado rebanhos só com estes animais e sim animais com padrões fenotípicos relativamente bem definidos. Nestes rebanhos foi constatado número variável de animais com prevalência de animais sem raça definida. Quanto ao padrão fenotípico, foram encontradas variações na pelagem com manchas, orelhas pendentes e chanfro subconvexo. Portanto, os resultados indicaram que, de fato, o ecótipo Gurguéia encontra-se em situação de risco de extinção (COSTA, 2010).

Assim nota-se a importância de pesquisas de caracterização genética desses animais com uso de técnica molecular para que se possa avaliar a estrutura das populações encontradas e a diversidade genética desses animais.

2.2 Conservação de Recursos Genéticos

Quando a América do Sul foi colonizada, as raças Ibéricas foram trazidas pelos portugueses e espanhóis. Estas evoluíram, ao longo dos séculos, adaptando-se às condições ambientais e ao manejo da região, dando origem às raças

naturalizadas brasileiras, também denominadas de locais ou num termo mais genérico, *crioulas* (EGITO, MARIANTE e ALBUQUERQUE, 2002).

Programas mundiais de conservação de recursos genéticos foram propostos com objetivo de reduzir a perda da variabilidade genética das populações locais, sendo a caracterização genética das populações o primeiro passo na tentativa de êxito (SAHAI e VIJH, 2000).

Segundo a FAO, elementos importantes nos programas nacionais de conservação incluem o inventário, a caracterização e a documentação dos dados obtidos. De acordo com Fitzhugh e Strauss (1992), prioridades devem ser dadas à caracterização e avaliação das populações nativas e a mensuração das diferenças entre e dentro das populações quando se trata de pesquisa.

Em 1995 a FAO em conjunto com a ISAG (*International Society of Animal Genetics*) formaram um grupo de consultores que elaboraram diretrizes e recomendações técnicas para a avaliação da diversidade genética em raças de animais domésticos. Através de um projeto intitulado *Measurement of Domestic Animal Diversity* (MoDAD) (http://www.fao.org/dad_is) selecionaram uma lista de *loci* de microssatélites para estudos de diversidade genética, caracterização de raças de bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves. No ano de 2004, a lista foi ampliada com a inclusão de novos marcadores (FAO, 2004).

Devido à uniformização dos dados gerados ao redor do mundo, é possível a comparação dos resultados de estudos de diversas populações.

Segundo Egito, Mariante e Albuquerque (2002), os objetivos da conservação de recursos genéticos animais no Brasil incluem: (a) identificar e caracterizar fenotipicamente núcleos de conservação, estabelecendo os centros de origem, diversidade e variabilidade genética, para os grupos ameaçados de extinção; (b) monitorar os núcleos de conservação já existentes; (c) implantar novos núcleos de conservação de raças que possam vir a ser identificadas e caracterizadas como ameaçadas de extinção; (d) conservar *ex situ* o material genético por meio da criopreservação de sêmen e embriões; (e) caracterizar geneticamente as populações envolvidas no Programa; e (f) conscientizar os diversos segmentos da sociedade sobre a importância da conservação dos recursos genéticos animais.

No Brasil, a partir de 1983, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) incluiu no seu Programa de Conservação de Recursos Genéticos, que até então contemplava apenas a conservação de plantas, a conservação dos

recursos genéticos animais. Neste Programa, a conservação é realizada por diversos Centros de Pesquisa da EMBRAPA com colaboração de Universidades, Empresas Estaduais de Pesquisa, assim como por criadores particulares, sendo esta rede coordenada pelo Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Na região Nordeste já existe interesse em definir estratégias de conservação de raças de animais naturalizados que se encontram em risco desconhecido de extinção, já sendo realidade programas de conservação de pequenos e grandes ruminantes como os bovinos da raça Pé-duro; os caprinos das raças Marota, Canindé e Azul; ovinos deslanados da raça Morada Nova; eqüinos estabelecidos na Baixada Maranhense e os suínos Piau, Moura e Tatu (EGITO, MARIANTE e ALBUQUERQUE, 2002).

2.3 Marcadores Moleculares

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou não de um segmento específico de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Milach (1998) cita que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente.

Esta classe de marcadores constitui uma ferramenta importante para a caracterização genética que, segundo Spritze (2003), é importante para programas de conservação de recursos genéticos animal, pois é útil na avaliação da distância entre as populações em estudo e pode auxiliar na escolha dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*, a partir da estimativa de índices de similaridade entre os indivíduos analisados. Além disso, podem ser usados em programas de melhoramento genético assistido.

A variação genética derivada de mudanças na molécula de DNA, atualmente pode ser avaliada por diferentes técnicas, desde a identificação da substituição de um simples nucleotídeo, denominada SNP's (*Single Nucleotide Polymorphisms*) até mutações que envolvem um número mais elevado de sítios de nucleotídeos (OLIVEIRA, 2007).

Dentre os diversos marcadores moleculares utilizados atualmente, encontram-se marcadores dominantes e codominantes. Nos marcadores moleculares dominantes alelos de um mesmo *locus* são revelados pela presença ou ausência de

uma banda que resulta na amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel. No entanto, não é possível saber se o *locus* amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos que constituem apenas uma classe, a que apresenta o alelo amplificado (LOPES et al., 2002).

São exemplos de marcadores dominantes RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorfism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*) e SSR (*Simple Sequence Repeat*) são exemplos de marcadores codominantes já que é possível distinguir os genótipos entre homozigotos e heterozigotos.

Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou ainda STR (*Sequence Tandem Repeat*) foram descritos por Tautz (1989) e são seqüências simples repetidas que se constituem em dois a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*.

A análise dos microssatélites é feita por amplificação a partir do DNA genômico usando *primers* que flanqueiam as seqüências nucleotídicas repetidas, sendo o produto das amplificações geralmente separado em géis de poliacrilamida, que apresentam resolução suficiente para separar esses fragmentos de DNA que diferem por poucos nucleotídeos (GUIMARÃES, 2001). A variação do tamanho dos produtos da PCR, geralmente, resulta da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Os marcadores SSRs são multialélicos e geralmente têm maior heterozigosidade sendo mais informativos do que os marcadores RAPD e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (POWEL et al., 1996). A facilidade de uso, a alta reprodutibilidade, o custo relativamente baixo e a abundância de microssatélites em organismos vivos o tornam um marcador ideal para a análise genética (BHARGAVA e FUENTES, 2010).

O uso de microssatélites como marcadores polimórficos de DNA tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, tanto no número de estudos quanto em número de organismos (BHARGAVA e FUENTES, 2010). Têm se tornado os mais populares marcadores em estudos de caracterização genética de bovinos (SUNNUCKS, 2000; CIVANOVA, PUTNOVA e DVORÁK, 2006) e ainda têm provado

ser útil para identificação de animais, determinação de paternidade, investigação de doenças, determinação da variação genética dentro e entre as raças, determinação da subestrutura de populações, reconstrução das relações filogenéticas entre populações e estudos históricos de domesticação e migração de raças (RITZ et al., 2000; NAICY e ANILKUMAR, 2008).

Marcadores microssatélites foram inicialmente desenvolvidos para pesquisas em humanos (BECKMANN e WEBER, 1992), mas tem sido extensivamente usado em análises genéticas de poríferos (CALDERON et al., 2007), insetos (ANDERSEN et al., 2005), moluscos (KENCHINGTON et al., 2006), peixes (MORAN et al., 2006; BUCKLIN, BANKS e HEDGECOCK, 2007), répteis (GLENN, DESSAVER e BRAUN, 1998), aves (GALBUSERA, VAN DONGEN e MATTHYSEN, 2000; HAYES, BRITTEN e BAKZEN, 2006), mamíferos (SAINUDIIN et al., 2004) e plantas (OLIVEIRA et al., 2006; ODENY et al., 2007; FUENTES et al., 2009).

Em caprinos vários estudos de diversidade genética e caracterização molecular têm sido realizados utilizando marcadores microssatélites (LUIKART et al., 1999; SAITBEKOVA et al., 1999; BARKER et al., 2001; LI, ZHAO e BIAN, 2002; MENEZES et al., 2006; ARAÚJO et al., 2008).

Apesar da técnica envolvendo marcadores microssatélites ser de fácil execução, sua maior limitação é a obtenção de *primers* específicos que flanqueiam as regiões de microssatélites, que pode ser considerado como uma desvantagem. Esta etapa requer a construção de bibliotecas genômicas enriquecida com os microssatélites de interesse e seqüenciamento de DNA, necessitando de laboratórios com infra-estrutura especializada (REGITANO e COUTINHO, 2001).

A descoberta de que *loci* de microssatélites podem ser conservados nos genomas de diferentes mamíferos (MOORE et al., 1991) indicou que *primers* desenvolvidos para amplificar repetições em uma espécie podem amplificar *loci* em outras espécies. A utilização de *primers* heterólogos, ou seja, *primers* que amplificam dentro de um mesmo gênero, família ou ordem, podem reduzir perda de tempo e dinheiro envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para cada espécie de interesse (ENGEL et al., 1996).

Contudo, a eficiência desses marcadores em estudos de conservação decresce de acordo com a distância evolutiva entre as espécies e até mesmo entre raças (SOULSBURY, IOSSA e EDWARDS, 2009). Problemas como a maior incidência de alelos nulos (não amplificação de um alelo, como resultado de mutações no sítio de ligação do primer),

homoplasia (fenômeno causado pela inserção ou deleção no fragmento amplificado) e alelo dropout (resultante de falha estocástica ao amplificar um alelo), podem ocasionar erros de genotipagem e conseqüentemente interferir nos resultados do estudo, pelo aumento ou diminuição da variabilidade genética (POMPANON et al., 2005; SOULSBURY, IOSSA e EDWARDS, 2009). Todos estes fatores devem ser levados em consideração na escolha e utilização dos microssatélites, sendo o processo de otimização dos marcadores uma etapa fundamental nos estudos genéticos. A partir da otimização é possível detectar tais problemas a ponto de se evitar erros na genotipagem.

2.4 Análises Estatísticas

A caracterização genética de populações com uso de marcadores moleculares tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para quantificação da diversidade genética de animais domésticos (MENEZES et al., 2006) porém, segundo Barker (1994), depende do número de *loci* analisados, da heterozigosidade e do número de amostras de cada população.

Dentre os parâmetros mais usados em estudos genéticos de populações através de marcadores moleculares, a estimativa da freqüência alélica, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), conteúdo de informação polimórfica (PIC), desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), estatística F (F_{ST} , F_{IT} e F_{IS}), e distâncias genéticas são os mais utilizados.

Freqüência alélica ou gênica é a freqüência de um determinado alelo numa dada população e é estimada através da contagem direta dos alelos em um *locus* e assumindo o pressuposto do equilíbrio de Hardy-Weinberg (ROCHA, 2009). A variância da freqüência alélica é dada pela expressão binomial:

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

Em que x é a freqüência alélica e n é o número de indivíduos da amostra. Segundo Nei (1987), o erro padrão das freqüências alélicas é obtido pela raiz quadrada da variância.

Segundo Barker (1994), a freqüência alélica constitui um parâmetro fundamental no estudo da evolução, uma vez que as alterações genéticas de uma população são descritas por mudanças em tais freqüências.

O EHW é um aspecto importante nos estudos de conservação genética, pois proporciona a base para detectar desvios nos acasalamentos ao acaso, testar a ocorrência de seleção, estimar as frequências alélicas nos *loci* que mostram dominância e modelar os efeitos de endogamia e seleção.

Segundo Falconer (1987), a propriedade da população conhecida como lei de Hardy-Weinberg, diz que numa grande população, sob acasalamento ao acaso, na ausência de migração, mutação e seleção, tanto as frequências gênicas como as genótípicas são constantes de geração em geração, e as frequências genótípicas são determinadas pelas frequências gênicas.

Qualquer alteração nas condições do EHW acima citadas promove o desvio do equilíbrio, que pode ser medido pela seguinte expressão:

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

A equação acima descreve a situação de uma população mendeliana com cruzamentos aleatórios, em que as frequências p e q permanecerão constante geração após geração.

Qualquer desvio significativo do EHW indicará que a população pode estar subdividida, que existe uma consangüinidade significativa ou que existe fluxo de genes de outra população (MENEZES et al., 2006). O teste exato para análise do EHW para cada *locus*/população foi descrito por Guo e Thompson (1992) usando o logaritmo em cadeia de Monte Carlo (poucos dados) ou cadeia Markov (muitos dados) para obter amostras aleatórias a partir de dados originais (permutação).

No método de Monte Carlo, o cruzamento ao acaso pode ser visto como a união ao acaso de dois gametas, gerando vários genótipos. Ao repetir este processo cria-se uma nova série de populações, sendo então testado o EHW, relativamente aos dados utilizados. Este método é mais adequado a pequenas populações com um grande número de alelos (BINDER e HEERMANN, 1988).

A utilização do segundo algoritmo leva à construção de uma cadeia de MARKOV, utilizada para obter uma estimativa, centrada, da probabilidade exata (GUO e THOMPSON, 1992). Esta cadeia de MARKOV é construída numa distribuição em equilíbrio, encontrando-se as probabilidades genótípicas em EHW, nas amostras que têm o mesmo número de alelos que os dados observados (GUO e

THOMPSON, 1992). Este método é mais rápido que o anterior quando o tamanho da amostra é grande ou moderada.

A heteroziguidade de um marcador molecular é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no *locus* e depende do número de alelos e de sua frequência na população.

A heteroziguidade pode ser considerada uma medida de variabilidade genética (MENEZES, 2006), não sendo este mais do que a proporção média de indivíduos heterozigóticos, por *locus*, de uma população. Um *locus* 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 nas amostras da população e no caso de uma população em EHW, é igual à proporção de heterozigóticos e foi denominada por Nei (1973) como diversidade genética.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (BOTSTEIN et al., 1980). No entanto, é um parâmetro que apresenta dependência do número de alelos e suas frequências. Dessa forma, o PIC não deve ser o único fator utilizado para eleger um marcador ou descartá-lo (MOAZAMI-GOUDARZI et al., 1994).

Consideram-se muito informativos os valores superiores a 0,5, mediantemente informativos entre 0,25 e 0,5 e pouco informativos quando inferiores a 0,25 (BOTSTEIN et al., 1980).

A teoria da estatística F foi proposta por Wright (1951) para medir os desvios das frequências genotípicas em populações subdivididas através de três parâmetros: F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} . Segundo Weir e Cockerham (1984), estes parâmetros fornecem uma maneira de sumarizar a estrutura da população.

A relação entre estes três parâmetros se apresenta da seguinte forma: $F_{IS} = (F_{IT} - F_{ST}) / (1 - F_{ST})$, em que F_{IT} é o índice de fixação ou coeficiente de consangüinidade nos indivíduos do conjunto populacional (consangüinidade global), F_{ST} o índice de fixação ou coeficiente de consangüinidade entre populações (devido a subdivisão) e F_{IS} o índice de fixação ou coeficiente de consangüinidade intra populacional (consangüinidade a nível populacional) (OLIVEIRA, 2007).

O F_{ST} quantifica o grau de divergência entre populações, descreve a proporção de variância dentro de uma espécie devida à subdivisão populacional e é

inversamente proporcional ao fluxo gênico. Os valores de F_{ST} variam de 0 (toda a diversidade gênica é compartilhada igualmente dentro de uma espécie e não há diferenças genéticas entre as populações) a 1 (toda a diversidade gênica dentro de uma espécie é encontrada como diferenças fixas entre populações e sem diversidade gênica dentro das populações). O F_{IS} é considerado o coeficiente de endogamia calculado como média de todos os indivíduos de todos os fragmentos populacionais e o F_{IT} corresponde à endogamia da 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.

A estatística F 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).

As diferenças genéticas entre populações ou espécies são medidas, de uma forma global, através das distâncias genéticas (CAVALLI-SFORZA et al., 1994). Estas expressam mais do que o grau de diferenciação entre um par de populações, expressam uma quantidade numérica (NEI, 1987). Assim, o número de substituições gênicas por *locus* é uma medida da distância genética.

As distâncias genéticas quantificam o grau de diferenciação entre dois grupos populacionais, ou seja, 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 micro evolução (NEI, 1973; NEI, 1987).

Na literatura encontram-se diferentes medidas de distâncias genéticas, tais como as distâncias de Jukes-Cantor (JUKE e CANTOR, 1969), Nei (NEI, 1973), a distância de Rogers (ROGERS, 1972), distância de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1978), distância de Reynolds (REYNOLDS et al., 1983), Cavalli-Sforza modificada (DA) de Nei et al. (1983), distância de Tamura e Nei (TAMURA e NEI, 1993), dentre outras distâncias.

O Método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*) baseia-se no agrupamento sucessivo de pares de táxons de acordo com o nível de similaridade.

Este método foi originalmente desenvolvido para construção de um fenograma (SKAL e MICHENER, 1958), mas atualmente pode ser usado na construção de árvores filogenéticas sempre que as distâncias utilizadas reflitam uma certa proporcionalidade com o tempo de evolução. O fundamento deste método de determinação de *clusters* é definir a distância *intercluster* como a média de todas as distâncias de pares para membros de dois *clusters*, para escolher o par de populações com menor distância entre os seus membros, originando a menor quebra possível da árvore (CAVALLI-SFORZA, 1993).

Taeteno et al. (1982), Nei et al. (1983) e Soundis e Krimbas (1987) mostraram que, quando a distância estimada está sujeita a grandes erros estocásticos, o UPGMA é superior a outros métodos de matrizes de distâncias para recuperar a árvore. Este método tenta estimar uma árvore de espécies ou a árvore gênica esperada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras de sangue foram coletadas em criatórios de sete municípios (Figura 3) da região Sul do Estado do Piauí. Esses municípios foram selecionados com base em levantamento anterior realizados por Costa (2010) sobre localização de rebanhos caprinos no Estado do Piauí com presença de animal com padrão fenotípico inerentes ao Gurguéia.

Os municípios onde estão localizados estes criatórios fazem parte do semi-árido, também chamado popularmente de "Sertão". Segundo descrição do Instituto Nacional do Semi-Árido (INSA) (2010), trata-se de área caracterizada por regime pluvial irregular, com 400 a 800 mm de precipitação anual. Apresenta solos rasos, com ocorrência de vegetação do tipo xerófila, resistente a longos períodos de estiagem.

A quantidade reduzida de amostras coletas (Tabela 2) foi em virtude da dificuldade em encontrar animais com padrão fenotípico do ecótipo Gurguéia bem definido.

Tabela 2 - Municípios onde foram coletadas as amostras de sangue de animais com características do ecótipo Gurguéia com as respectivas coordenadas e número de indivíduos coletados, Teresina – Piauí, 2011.

Município	Localização Geográfica	Núm. de Genótipos
Acauã	8°18'39,75"s 41°3'0,549"w	17
Queimada Nova	8°34'12,15"s 41°25'15,02"w	5
São Raimundo Nonato	9°3'39,07"s 42°38'46,56"w	11
Jurema	7°27'06,30"s 41°51'53,63"w	4
Dom Inocêncio	9°0'13,79"s 41°58'11"w	4
Colônia do Piauí	7°13'41,27"s 42°9'53,05"w	8
Oeiras	7°1'55,25"s 42°9'24,74"w	13
Total		62



Figura 3 - Mapa do Piauí com localização geográfica dos rebanhos Gurguéia amostrados, Teresina -PI, 2011.

Coletou-se aproximadamente 170 μ L de sangue da orelha de cada animal com auxílio de seringas e depositou-se imediatamente sob cartões FTA (*Flinders Technology Associates*) (Whatman Inc.®). Cada amostra foi colocada em uma área delimitada do cartão e devidamente identificada, de modo a se colocar quatro amostras por cartão (Figura 4).

A tecnologia FTA permite que o DNA de diferentes tipos de amostras (sangue, células bucais, saliva, secreção, tecidos, etc) seja imobilizado e conservado em

temperatura ambiente por anos, podendo ser analisado rapidamente quando necessário (Whatman Inc.®).

Os cartões com as amostras de sangue foram colocados em envelopes de papel e armazenados no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa meio-Norte à temperatura ambiente. Eles permaneceram acondicionados por cerca de dois meses até a realização das análises.



Figura 4 - Cartão FTA impregnado com amostras de sangue de caprinos Gurguéia, perfurador e esteira de apoio, Teresina – Piauí, 2011.

3.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído no laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, conforme protocolo do fabricante (Whatman Inc.®). Foi removido um disco de 1,2 mm de cartão FTA com ajuda do perfurador e da esteira para apoiar o cartão e colocado em um tubo para PCR onde se adicionou 200 μ L de reagente de purificação FTA e manteve-se incubado em condições ambiente por 5 minutos. Logo após o reagente foi descartado e o processo foi repetido por três vezes. Na segunda etapa adicionou-se 200 μ L de TE (Tris EDTA, pH 8,0) ao tubo e incubou por 5 minutos, descartou-se e repetiu este processo por duas vezes. Em seguida, o disco foi deixado para secar por 1 hora em temperatura ambiente. Após este processo o disco contendo o DNA ficou pronto para ser usado na PCR.

3.3 Otimização dos *primers*

Foram utilizados os *primers* de microssatélites ILSTS011, ILSTS019, INRA006, INRA23, INRA63, INRABERN172, MAF65, CSRD247, OarFCB48 e SRCRSP23 apresentados na Tabela 2. Destes, os *primers* ILSTS011, ILSTS019, INRA006, INRA23, INRA63 e INRABERN172 foram desenvolvidos para bovino e os *primers* MAF65, CSRD247 e OarFCB48 para ovinos, sendo que deste painel, apenas o *primer* SRCRSP23 foi desenvolvido para caprinos (FAO, 2004). No entanto, todos os *primers* utilizados no presente estudo são recomendados pela FAO para estudos dessa natureza.

Os *primers* foram testados com o DNA de quatro amostras diferentes para verificação da amplificação e padronização das reações PCR.

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 10 µL com os seguintes componentes: cerca de 20 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTP, 0,5 mM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1 a 2,5 mM de MgCl₂, a quantidade tampão de reação 10x (10mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1.5mM MgCl₂) variou de acordo com a concentração de MgCl₂ utilizada, 0,1 U/µL de Taq DNA polimerase (BioLabs) e água deionizada para completar o volume final da reação.

A mistura total da reação PCR foi submetida ao termociclador gradiente modelo Veriti® 96-well thermalcycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação 95°C por 7 minutos, seguido por 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a temperatura de anelamento de cada par de *primer* e 45 segundos a 72°C. A extensão final foi feita a 72°C por 20 minutos, seguido de armazenamento a 12°C. Foram testadas temperaturas de anelamento variando de 53°C a 60°C para todos os *primers*.

Os produtos das reações de PCR (*amplicons*) foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) desnaturante a 6% corado com nitrato de prata, seguindo o protocolo descrito por Benbouza et al. (2006), com as seguintes modificações: solução de fixação (etanol 20 %, ácido acético PA glacial 0,5 %) por 5 minutos; solução de nitrato de prata (9 mM) com formaldeído (1,5 mL / L) por 7 minutos; e, revelador (NaOH 0,37 M) com formaldeído (2,0 mL / L) 5 a 7 minutos ou até o aparecimento das bandas. Após aproximadamente duas horas uma imagem do gel de poliacrilamida foi digitalizada em *scanner* e gravada para posterior análise dos *amplicons*.

Tabela 3- Descrição dos *primers* de microssatélites utilizados no estudo da caracterização genética de caprinos Gurguéia, Teresina – Piauí, 2011.

<i>Primers</i>	Sequencia dos <i>primers</i> <i>Forward Reverse (5'→3')</i>	GenBank (número de acesso)	Tam anho dos alelo s (pb)*	Cromossomo	Referência
ILSTS011	GCTTGCTACATGGAAAGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC	L23485.1	256- 294	BTA14	Luikart et al. (1999)
ILSTS019	AAGGGACCTCATGTAGAAGC ACTTTTGGACCCTGTAGTGC	L23492.1	144- 156	Ann	FAO (2004)
INRA006	TGAGCTGGGGTGGGAGCTATAAATA AGGAATATCTGTATCAACCGCAGTC		106- 126	CH3	Bishop et al. (1994)
INRA23	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTTAGATGAACT	X80215.1	196- 215	BTA3	Li, et al. (2002)
INRA63	GACCACAAAGGGATTTGCACAAGC AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	X71507.1	164- 186	CH118	Barker, et al. (2001)
INRABERN172	CCACTTCCCTGTATCCTCCT GGTGCTCCCATTGTGTAGAC		234- 256	BTA26	FAO (2004)
MAF65	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	M67437.1	116- 158	OAR15	Luikart, et al (1999)
CSR247	GGACTTGCCAGAACTCTGCAAT CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG	EU009450.1	220- 247	OAR14	FAO (2004)
OarFCB48	GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	M82875.1	149- 173	OAR17	Barker et al. (2001)
SRCRSP23	TGAACGGGTAAAGATGTG TGTTTTAATGGCTGAGTAG		81- 119	Desconhecido	Luikart et al. (1999)

*de acordo com a referência.

Foi utilizado um marcador de DNA com bandas de comprimento conhecido variando em 10 pares de bases (pb) (Invitrogen) para auxiliar na determinação do tamanho dos alelos.

Após a determinação das condições ideais de PCR para cada *primer*, foram realizadas as genotipagens.

3.4 Análise Estatística

O programa GENEPOP v.4.0.10 (ROUSSET, 2008) foi usado para estimar as frequências alélicas em cada loco, por meio de contagem direta, calcular as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) e verificar a ocorrência do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). O valor de p (probabilidades) foi calculado utilizando-se o procedimento da cadeia de Monte Carlo. Uma correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) foi aplicada para corrigir efeitos de múltiplas comparações para reduzir a possibilidade de resultados erroneamente significantes (erro tipo I). Foi usado um nível global de significância de 0,05.

A estatística F pela análise do FIS (coeficiente de endogamia), de acordo com a fórmula desenvolvida por Nei (1987) também foi calculada pelo programa GENEPOP. Os valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) para cada marcador microssatélite foram calculados pelo programa Cervus, versão 3.0.3 (MARSHALL et al, 1998).

Os dados genéticos foram agrupados de acordo com os municípios em que foram coletados. A variância genética global entre os rebanhos foi avaliada por Análise de Variância Molecular – AMOVA (EXCOFFIER, SMOUSE e QUATTRO, 1992). Os componentes de variância genética foram testados para desvios significativos de zero a 1000 permutações produtores de genótipos multiloci usando ARLEQUIN v. 3.1 (EXCOFFIER, LAVAL e SCHNEIDER, 2006).

A matriz de distância das populações foi elaborada pelo programa ARLEQUIN e utilizada para construir o dendrograma pelo método UPGMA com auxílio do programa PAST (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dez *primers* testados mostraram boa resolução em gel de poliacrilamida 6% desnaturante (Figura 5) quando submetidos às condições de amplificação após o processo de otimização conforme a Tabela 4. As concentrações de cada *primer*, dNTP e Taq DNA polimerase foram fixadas em 0,5 mM, 200 μ M e 0,1 U/ μ L, respectivamente.

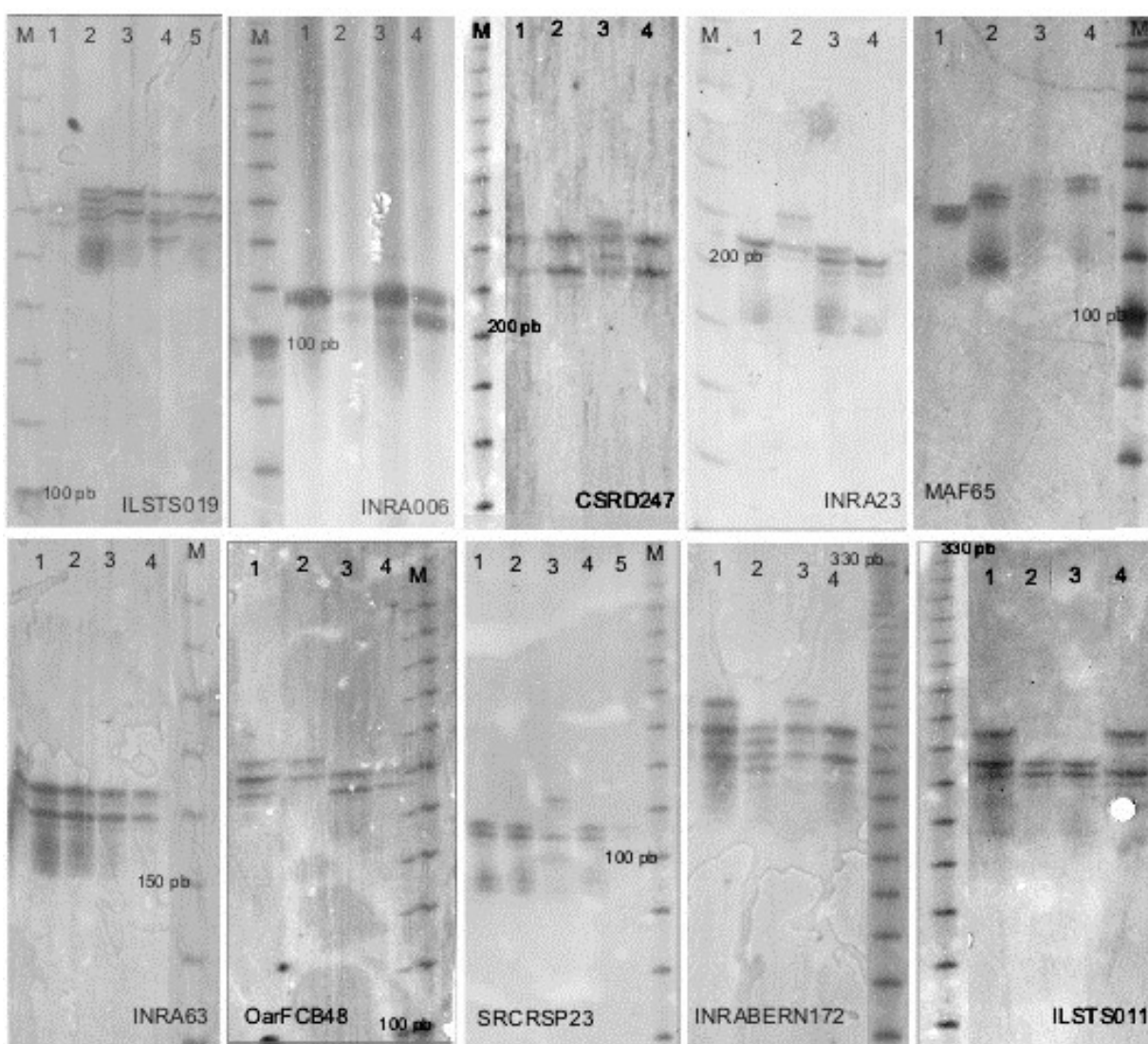


Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida mostrando os dez marcadores microssatélites otimizados para caprinos do ecótipo Gurguéia. M: Marcador 10 pb.

Apesar do uso destes *loci* em caracterização de outros grupos genéticos de caprinos naturalizados, foram necessárias alterações na concentração de cloreto de

magnésio e nas temperaturas de anelamento para a obtenção de padrões de bandas bem definidos já que na maioria dos *loci* analisados, foi observada a presença de muitas bandas, provavelmente como consequência do anelamento não específico do *primer*. Nesse caso, dois procedimentos têm sido utilizados para diminuir a intensidade dos fragmentos inespecíficos ou eliminá-los: primeiro recomenda-se a redução na concentração de cloreto de magnésio que age como co-fator para a atividade da enzima Taq DNA polimerase, de forma que, ao diminuir a quantidade desse reagente, elimina-se a possibilidade de amplificação de produtos inespecíficos. O segundo procedimento recomendado é a elevação da temperatura de anelamento, que permite que as seqüências iniciadoras se liguem apenas ao fragmento alvo. Segundo Koret, O'Leary e McGee (1996), a temperatura de anelamento ótima varia de 3 a 12°C acima da Temperatura de *melting* (T_m) teórica faixa também considerada ótima nesse estudo.

Tabela 4 – Condições de otimização dos *loci* de microssatélites utilizando a técnica de PCR para amplificação de DNA de caprinos do ecótipo Gurguéia, Teresina – PI, 2011.

<i>Primer</i>	T _a (°C)	Tampão 10X (µL)	MgCl ₂ (mM)
ILSTS011	55	1,0	1,5
ILSTS019	55	1,0	1,5
INRA006	55	1,33	2,0
INRA23	55	1,0	1,5
INRA63	55	1,66	2,5
INRABERN172	55	1,66	2,5
MAF65	55	1,0	1,5
CSRD247	55	1,66	2,5
OarFCB48	56	1,0	1,5
SRCRSP23	58	1,33	2,0

De acordo com Selkoe e Toonen (2006), na otimização dos marcadores é importante o uso de temperaturas de anelamento que sejam as mais altas possíveis e que ocorra uma redução no tempo de extensão do fragmento. Esse procedimento contribui para a diminuição no número de bandas inespecíficas, dado ao conhecimento da taxa de incorporação de nucleotídeos pela DNA polimerase (35 – 100 nucleotídeos por segundos em 70 – 80°C para Taq DNA polimerase).

Após o processo de otimização, todos os dez *loci* de microssatélite mostraram-se eficientes na genotipagem do DNA de caprinos naturalizados pertencentes ao ecótipo Gurguéia.

Os *loci* ILSTS019, INRA006 e INRA63 mostraram alelos exclusivos que não foram constatados nos estudos de caracterização molecular usando marcadores microssatélites em outras raças naturalizadas de caprinos do Brasil (MENEZES et al., 2006; COSTA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2008), fato que pode sugerir a existência de diversidade entre o grupo Gurguéia e outras populações caprinas naturalizadas do Nordeste. Entretanto, somente com estudo comparativo para mensurar efetivamente tais diferenças entre essas populações poderia comprovar em hipótese

Os demais *loci* analisados no presente estudo apresentaram tamanho e número de alelos de acordo com o apresentado na literatura (Tabela 5).

A não utilização do número necessário de animais para estudo dessa natureza que, segundo Hedrick (2005) deve ser no mínimo 100 animais, foi em razão da dificuldade da localização de animais com o padrão fenotípico Gurguéia, sendo amostrado apenas 62 animais num total de 7 rebanhos (Tabela 2). Assim, considera-se que esse fato em si já serve como boa indicação da situação em que se encontram esses animais no Estado do Piauí.

Além disso, não foi constatada existência de criadores demonstrando interesse por esse grupo genético, tanto em termos de produção como conservação. Assim, por se tratar de material genético tido como originário da região Sul do Piauí (MEDEIROS et al, 1987), remete ao poder público a obrigação de estudá-lo e, posteriormente definir estratégias de recuperação e conservação.

No presente estudo foram identificados 104 alelos nos dez *loci* analisados, portanto com número médio de 10,4 alelos por *locus*, sendo que variou de seis alelos no CSR247 a 15 alelos no INRA63 (Tabela 5). Esse número de alelos por *locus* é superior ao valor recomendado pela FAO para caracterizar a presença de diversidade genética, que sugere pelo menos cinco alelos por *locus* para que seja considerado um bom indicador de variabilidade genética. Os valores referentes ao número médio de alelos e tamanho dos fragmentos amplificados foram semelhantes aos encontrados por Li et al. (2002), Araújo (2004) e Menezes et al. (2006) em estudos de caracterização genética em caprinos naturalizados. Segundo Barker

(1994), número inferior a quatro alelos por *locus* reduz o efeito sobre o erro padrão para cálculos de distância genética entre populações.

Tabela 5 - Diversidade genética das populações de caprinos Gurguéia no Estado do Piauí. N, número de alelos; H_o , heterozigosidade observada; H_e , heterozigosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica; F_{IS} , índice de fixação de subpopulações; F_{IT} , índice de fixação da população total; F_{ST} , índice de fixação da subpopulações dentro da população total, Teresina – Piauí, 2011.

Locus	N	H_o	H_e	PIC	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
ILSTS19	9	0,576	0,808	0,774	0,216	0,147	0,318
INRABERN172	13	0,797	0,846	0,821	0,025	0,101	0,073
ILSTS11	9	0,623	0,854	0,831	0,258	0,095	0,279
INRA23	8	0,839	0,842	0,815	-0,044	0,047	0,026
INRA06	12	0,823	0,883	0,862	-0,025	0,158	0,107
SRCRSP023	13	0,871	0,909	0,893	-0,001	0,073	0,611
MAF65	8	0,783	0,875	0,852	0,069	0,090	0,121
OARFCB48	11	0,726	0,823	0,790	0,051	0,128	0,148
INRA63	15	0,855	0,867	0,846	-0,023	0,040	0,031
CRSD247	6	0,855	0,804	0,770	-0,105	0,047	-0,044
Média	10,4	0,775	0,851	0,825	0,042	0,093	0,167

O valor médio de PIC foi de 0,825 variando de 0,774 (ILSTS19) a 0,893 (SRCRS023), o que indica alta diversidade e polimorfismo nos rebanhos analisados (Tabela 5). O PIC depende do número de alelos e de suas frequências e, segundo Medeiros et al. (2006), a presença de lócus com número médio de alelos elevados pode diminuir a eficiência das análises. Portanto, a informação que este parâmetro produz não deve ser o único aspecto para seleção ou descarte de um marcador (MOAZAMI-GOUDARZI et al., 1994).

O valor médio da heterozigosidade esperada foi de 0,851, da observada foi de 0,775 e, de maneira geral, todos os *loci* apresentaram valores de heterozigosidade observada maiores que 0,7, com exceção dos *loci* ILSTS19 e ILSTS11, porém apenas o primeiro apresentou PIC abaixo da média (Tabela 5). Segundo Ott (1992), um marcador é considerado altamente polimórfico quando apresenta heterozigosidade maior que 70%, fato observado para todos os dez marcadores estudados.

Foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) em quase todos os *loci* analisados. Os desvios observados podem ter sido causados por endogamia, pela não amplificação ou presença de alelos nulos, por migração ou fluxo de genes, ou ainda como consequência do efeito de amostragem

oriundo do pequeno tamanho das populações amostradas, o que pode promover mudanças nas frequências gênicas e forçar a população a se desviar do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Rocha (2009) observou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg em oito marcadores que utilizou para caracterizar geneticamente populações de caprinos naturalizados e quatro destes marcadores (OarFCB48, INRA63, ILSTS11 e MAF65) também se encontram em desequilíbrio nesse estudo. Segundo Menezes et al. (2006), resultados como estes podem ser esperados em raças comerciais e em raças ameaçadas de extinção.

A estatística F calculada para todos os *loci* (Tabela 5) mostra valores de F_{IS} maior que 0,1 em dois *loci* (ILSTS19 e ILSTS11) o que sugere excesso de homozigotos. Segundo Liu et al. (2008), os valores do F_{IS} podem variar de -1 (todos os indivíduos heterozigotos), 0 (associação de alelos ao acaso) e 1 (todos os indivíduos homozigotos).

O valor médio de F_{ST} obtido foi de 0,093, indicando diferenciação genética moderada. Segundo a definição de Hartl e Clarck, (1997) e Wright (1978) o valor de F_{ST} , que mede o grau de diferenciação genética entre populações, considerando a definição desta estatística pode presumir que um valor obtido na faixa entre 0 a 0,05 indica uma diferenciação genética pequena, entre 0,05 e 0,15 indica diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25 indica um grau de diferenciação elevado e valores acima de 0,25 uma diferenciação muito grande.

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou variabilidade genética entre e dentro dos grupos amostrados, porém, com maior diferença dentro dos rebanhos (90,71%) do que entre (9,29%) (Tabela 6). Estes dados corroboram com grande parte dos estudos de diversidade, onde a variabilidade genética dentro das populações é, geralmente, maior que entre populações. As variações gênicas dentro da população são extremamente importantes para qualquer espécie, não apenas por favorecer processo de especiação, mas também, por ser um dos pilares para elaboração de programas de melhoramento genético. Egito, Mariante e Albuquerque (1999) confirmam que as raças naturalizadas apresentam maior variabilidade gênica que as raças exóticas, ressaltando a importância de que estas sejam conservadas.

O dendrograma construído a partir da matriz de distância (Tabela 7) pelo método UPGMA, mostra o relacionamento entre as populações estudadas (Figura 6).

Tabela 6 – AMOVA - Análise de Variância Molecular entre as populações estudadas, Teresina – Piauí, 2011.

Fontes de variação	G.L	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	6	60,600	0,4028 Va	9,2882
Dentro populações	109	421,906	3,9339 Vb	90,712
Total	115	482,507	4,3368	

Tabela 7 - Matriz de distância das populações estudadas nos diferentes municípios: 1, Acauã; 2, Queimada Nova; 3, São Raimundo Nonato, 4, Jurema; 5, Dom Inocêncio; 6, Colônia do Piauí e 7, Oeiras, Teresina - PI, 2011.

	1	2	3	4	5	6	7
1	0,000						
2	0,052	0,000					
3	0,072	0,086	0,000				
4	0,082	0,085	0,048	0,000			
5	0,153	0,176	0,098	0,096	0,000		
6	0,091	0,126	0,053	0,077	0,099	0,000	
7	0,118	0,123	0,057	0,097	0,103	0,022	0,000

As populações agruparam de acordo com a localização geográfica. Acauã e Queimada Nova são municípios limítrofes e fazem parte do Alto Médio Canindé (IBGE, 2008). A distância genética entre os animais dos dois municípios foi de 0,052. Os municípios de São Raimundo Nonato e Jurema também são limítrofes, fazem parte da microrregião de São Raimundo Nonato, juntamente com Dom Inocêncio (IBGE, 2008). Quando comparados, Jurema e São Raimundo Nonato apresentaram distância genética de 0,048. A população de caprinos Gurguéia do município de Dom Inocêncio foi a que se apresentou, geneticamente, mais distante dos demais municípios, o que pode ser observado no dendrograma, Figura 6. Tal resultado pode ser atribuído ao difícil acesso ao município de Dom Inocêncio, o que torna os animais deste município isolados geograficamente.

Os Municípios de Oeiras e Colônia do Piauí são limítrofes e pertence à microrregião de Picos (IBGE, 2008). A menor distância genética foi encontrada entre estas duas populações (0,022).

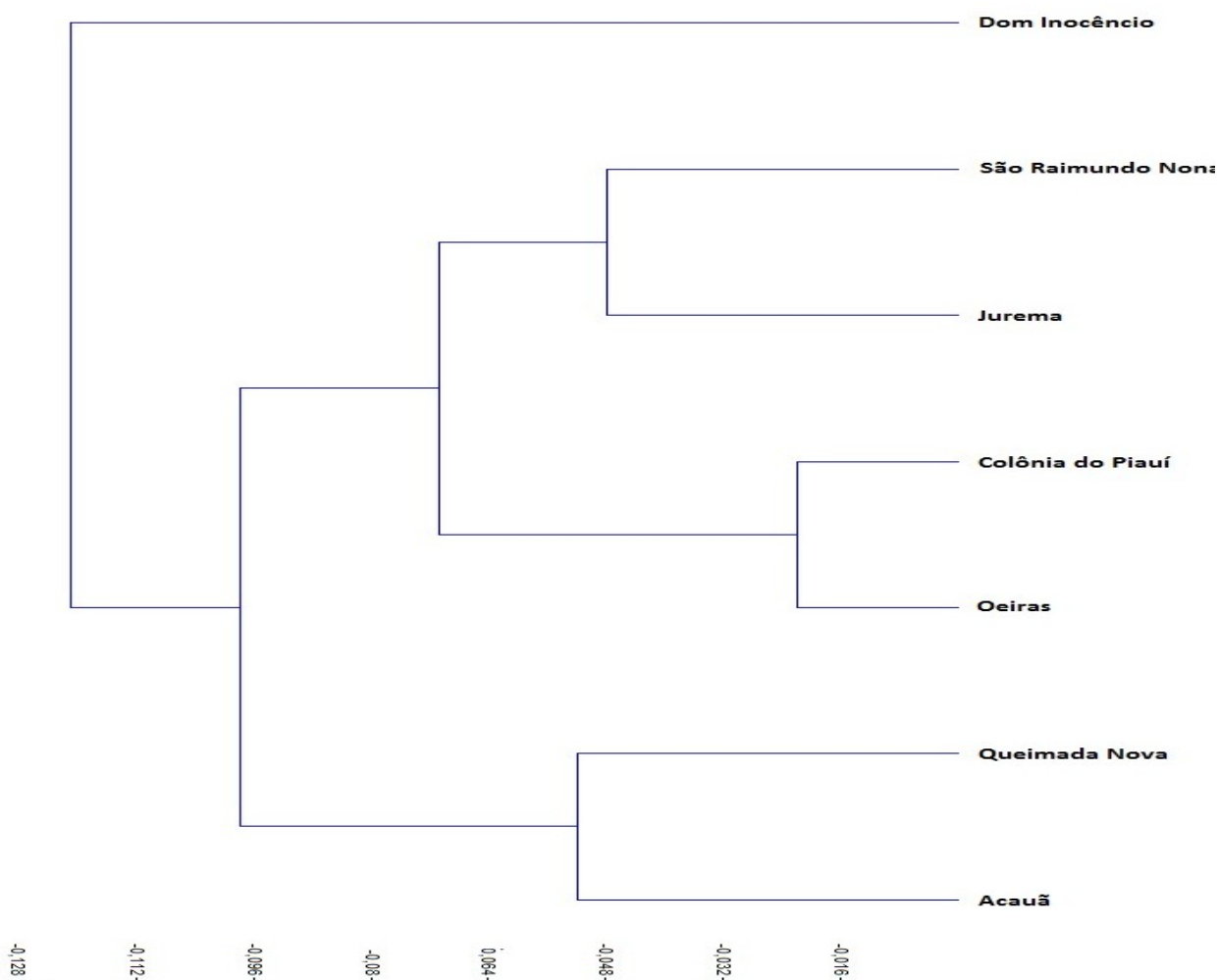


Figura 6 - Dendrograma construído pelo método UPGMA, mostrando a relação entre as populações estudadas. Teresina – Piauí, 2011.

Estes são os primeiros resultados sobre a diversidade genética e estrutura de população de caprinos Gurguéia utilizando marcadores moleculares microssatélites. Embora, seja possível verificar a existência de moderada estrutura populacional e afirmar sobre a diversidade genética entre os grupos para os *loci* avaliados, reconhecem-se a necessidade de incluir indivíduos Gurguéia de outros locais da Região Nordeste e de outras raças para consolidar as informações sobre a estrutura genética e populacional deste grupo de caprinos naturalizados.

5 CONCLUSÃO

Todos os *loci* de microssatélites analisados apresentaram polimorfismo, sendo indicados para estudo de diversidade genética em caprinos do ecótipo Gurguéia.

As populações estudadas apresentaram-se moderadamente estruturadas.

Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores de F_{IS} positivos, demonstram haver perda da heterozigosidade, porém há indicativos de diversidade nos rebanhos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo forneceu uma visão preliminar sobre a estrutura populacional dos caprinos naturalizados do ecótipo Gurguéia encontrados no Estado do Piauí. Vale ressaltar que os marcadores microssatélites utilizados foram eficientes no estudo da variabilidade genética destes animais.

Tal estudo contribuirá para ações de conservação desses animais e para maiores esclarecimentos sobre o uso destes na agricultura familiar.

Uma quantidade significativa de sangue depositado em cartões FTA encontra-se armazenados no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte. Tal iniciativa é importante em virtude do risco de extinção crítico em que os animais deste ecótipo se encontram.

Estudos de filogenia entre o ecótipo Gurguéia e a raça Parda Alpina devem ser realizados, a fim de que se confirme a descendência especulada a partir de caracteres morfológicos. Além de estudos de estimativas de distância genética do ecótipo Gurguéia em relação a outros grupos de caprinos naturalizados.

Em função do pequeno número de animais encontrados para este estudo recomenda-se que seja elaborado plano de ação a partir de levantamento minucioso nos diversos municípios do Estado do Piauí para resguardar animais com melhor padrão fenotípico característico para implantação de núcleos de conservação e resgate deste ecótipo, dado seu risco de extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.J.O. **Caracterização de caprinos da raça Marota no Brasil**. 2007. 128f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa Integrado de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2007.
- ANDERSEN, D. H. et al. Characterization of microsatellite *loci* in the stick insects *Bacillus rossius rossius*, *Bacillus rossius redtenbacheri* and *Bacillus whitei* (Insecta: *Phasmatodea*). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.576–578, 2005.
- ARAÚJO, A.M. **Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA**. 2004. Tese (Genética e Melhoramento) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa- Viçosa, 2004.
- ARAÚJO, A.M. et al. Caracterização biométrica e molecular do caprino Nambi o estado do Piauí. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**; **85**). Embrapa Meio-Norte, p19. 2008.
- BARKER, J.S.F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph, v.21, p.501-508, 1994.
- BARKER, J.S.F. et al. Genetic variation within and relationship among populations of Asian goats (*Capra hircus*). **Journal of Animal Breeding Genetics**, v.118, p.213-233, 2001.
- BECKMANN, J. S.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, v.12, p.627–631, 1992.
- BENBOUZA, H. et al. Optimization of reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. **Biotechnology Agronomy Society and Environment**, v.10, n.2. p. 77-81, 2006.
- BHARGAVA, A; FUENTES, F. F. Mutational Dynamics of Microsatellites. **Molecular Biotechnology**, v.44 (3), p.250-266, 2010.
- BINDER, K. e HEERMANN, D.W. Monte Carlo Methods in Statistical Physics. **Spring-Verlag**, Berlim, Alemanha, 127 pp, 1988.
- BISHOP, M.D. et al. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, 136:619-639, 1994.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006.
- BOTSTEIN, D., et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BUCKLIN, K. A.; BANKS, M. A.; HEDGECOCK, D. Assessing genetic diversity of protected coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations in California. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.64, p.30–42, 2007.

CALDERON, I. et al. Finding the relevant scale: Clonality and genetic structure in a marine invertebrate (*Crambe crambe*, Porifera). **Molecular Ecology**, v.16, p.1799–1810, 2007.

CIVANOVA, K., PUTNOVÁ L., DVORÁK, J. Analysis of microsatellite set for biodiversity studies in horses. **Acta fytotechnica et zootechnica**, p.39-40, 2006.

COSTA, M. S. et al. Caracterização genética de caprinos Marota no estado do Piauí por meio de Microsatélites de DNA. In: **Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**, 7. São Carlos, 2008. Resumo... São Carlos: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2008, Cd Room.

COSTA, M.S. **Inventário e caracterização de caprinos do grupo naturalizado Gurguéia e sua relação com os principais grupos genéticos do semi-árido do Estado do Piauí**. 2009. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. Situação atual da caracterização genética animal na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: II SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC. Brasília, 1999. **Proceeding...** Brasília, 1999. CD-ROM.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, n.193-194, p.39-52, 2002.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Country report on the state of animal genetic resources Brazil**. Brasília, 2003.

ENGEL, S.R., et al. Conservation of microsatellite loci across species of Artiodactyls: implications for population studies. **Journal Mammalian**, v.77, p. 504-518, 1996.

EXCOFFIER, L.P.E.; MOUSE, S.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA data. **Genetics**, 131: 479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. Arlequin v. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. **Genetics and Biometrics Laboratory**, University of Geneva, Switzerland. 2006.

FALCONER, D.S. Constituição genética das populações. In: _____. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa: Impr. Univ. 1987. p. 5-8.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3° ed. Brasília: Embrapa-Cernagen, 220 p, 1998.

FIGUEIREDO, E.A.P. de. et al. **Brazilian goats: genetic resources**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987, Brasília. Proceedings... Brasília : EMBRAPA/IGA, v.1, p.683-699, 1987.

FITZHUGH, H.A.; STRAUSS, M. S. **Management of global animal genetic resources organizational and institutional structure**. In: Hodges, J. (Ed.). The management of global animal genetic resources. Proceedings of an FAO Expert Consultation. Rome: FAO, 309 p, 1992.

FUENTES, F.F. et al. Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. **Conservation Genetics**, v.10, p.369–377, 2009.

GALBUSERA, P., VAN DONGEN, S., MATTHYSEN, E. Crossspecies amplification of microsatellite *primers* in passerine birds. **Conservation Genetics**, v.1, p.163–168, 2000.

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

GROENEVELD, L. F., et al. *GLoBALDIV Consortium. Genetic diversity in farm animals - a review*. **Animal Genetics**, v.41, p.6-31, 2010.

GUIMARÃES, S.E.F., 2001. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidados em melhoramento animal. In: Pereira, J.C.C., 2001. **Melhoramento genético aplicado a produção Animal**. 3. Ed. – Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2001. p 445-477.

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

HAMMER, O., HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletronica**, v.4 (1): p.9, 2001.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. (1997) **Principles of Population Genetics**. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, 481pp.

HAYES, M. A., BRITTEN, H. B., BARZEN, J. A. Extra-pair fertilizations in sandhill cranes revealed using microsatellite DNA markers. **The Condor**, v.108, p.970–976, 2006.

HEDRICK, P. W. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, v53, p.313–318, 1999.

GLENN, T.C., DESSAUER, H. C., BRAUN, M. J. Characterization of microsatellite DNA *loci* in American alligators. **Copeia**, v.3, p.591–601, 1998.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Divisão Territorial do Brasil. **Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais**. (1 de julho de 2008). Página visitada em 11 de outubro de 2010.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. SIDRA. Pesquisa Pecuária Municipal, 2009. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=22&i=P> Acesso em: 20.12.2010.

INSA. Instituto Nacional do Semi-árido. 2010. http://www.insa.gov.br/index.php?option=com_Content&task=view&id=17&Itemid=64. Acesso em 15.01.2010.

JUKES, T.H. ; CANTOR, C.R. Evolution of Protein Molecules. New York: **Academic Press**. p. 21–132, 1969.

KENCHINGTON, E. L. et al. Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve mollusc (*Placopecten magellanicus*). **Molecular Ecology**, v.15, p.1781–1796, 2006.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. v.75, p.2868-2872, 1978.

KORET, J.; O'LEARY, J.J.; MCGEE, J.O'D. Microsatellites and PCR genomic analysis. **Journal of Pathology**, v.178, p.239-248, 1996.

LI, M.H.; ZHAO, S.H.; BIAN, C. et al. Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite. **Genetics Selection and Evolution**, v.34, p.729-744, 2002.

LIU, G.Q. et al. Analysis of genetic diversity of 539 Yangzhou chicken by microsatellite markers. **International Journal of Poultry Science**, v.7, p. 1237-1241, 2008.

LÔBO, R.N.B. et al. Brazilian goat breeding programs. **Small Ruminant Research**, v.89, p. 149-154, 2010.

LOPES, R. et al. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP): Aspectos Técnicos e Interpretação Genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 29, 5, 2002.

LUIKART, G. et al. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). **Animal Genetics**. v.30, p.431-438, 1999.

MACHADO, T. M. M. **Le peuplement des animaux de ferme et l'élevage de La chèvre au Brésil avec une étude Du polymorphisme visible de La chèvre Du Ceará.** Paris: Université de Paris XI. P.119-217, 1995 (thèse docteur em Sciences).

MACHADO, T.M.M., CHAKIR, M. LAUVERGNE, J.J. Genetic, Distance and Taxonomic Tree Between Goats of Ceará State (Brazil) and Goats of Mediterranean Region (Europe and Africa). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.1, p.121-125, 2000.

MARSHALL, T.C. et al. Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, n.5, pp. 639-655, 1998.

MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N.; GIRÃO, E. S. **Eficiência reprodutiva de cabras da raça e/ou tipo Gurguéia, no Município de Teresina, PI.** EMBRAPA Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Teresina, 3 p. (EMBRAPA/UEPAE. 45), 1987.

MEDEIROS, L. P. et al. **Caprinos: Princípios básicos para sua exploração.** Teresina: EMBRAPA – CAPAMN, 1994.

MENEZES, M. P. C. et al. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando 27 marcadores microsatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, n.4, p.1336-1341, 2006.

MENOTTI-RAYMOND, M.A., O'BRIEN, S.J. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. **Journal of Heredity**, v.86, p.319–322, 1995.

MILACH, S.C.K. Principais Tipos de Marcadores e suas Características. In: Milach, S. **Marcadores Moleculares em Plantas.** Porto Alegre: S. C. K. Milach, p. 17-28, 1998.

MOAZAMI-GOUDARZI, K. et al. Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers resultants. **Genetics Selection and Evolution**. v. 26, p. 155-165. 1994.

MOORE, S. S., et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654-660, 1991.

MORAN, P. et al. Standardising multi-laboratory microsatellite data in Pacific salmon: An historical view of the future. **Ecology of Freshwater Fish**, v.15, p.597–605, 2006.

NAICY, T.; ANILKUMAR K. Genetic Characteristics of Five Microsatellite Markers Associated with Milk Production Traits in Crossbred Dairy Cattle of Kerala. **Veterinary World**, v.8, p.245-247, 2008.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p.3321-3323, 1973.

NEI, M. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. **Evolution of genes and proteins** (Nei, M. and. Khoen., R. Ed.), p. 165-190, 1983.

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

ODENY, D.A. et al. Development, characterization and utilization of microsatellite markers in pigeonpea. **Plant Breeding**, v.126, p.130–136, 2007.

OLIVEIRA, J. C. V. et al. Caracterização e perfil genético visível de caprinos nativos no estado de Pernambuco. **Archivos de Zootecnia**, v.55, p 63-73, 2006

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294–307, 2007.

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

POMPANON, F., et al. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Review Genetics**, v.6, p.847-849, 2005.

POWELL, W., et al. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breed**, v.2, p.225-238, 1996.

REGITANO, L.C.A.; L.L. COUTINHO. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informações tecnologias, 215p, 2001.

REYNOLDS, J. Estimation of the coancestry coefficient basis for a short-term genetic distance. **Genetics**. v.105, p.767-779, 1983.

RIBEIRO, V.L., et al. Comportamento ingestivo de caprinos Moxotó e Canindé submetidos a alimentacao a vontade e restrita. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.28, n.3, p.331-337, 2006.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v.43, p.223-225, 1989.

RITZ, R.L. et al. Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites. **Animal Genetics**, v.31, p.178-185, 2000.

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, 1998.

ROCHA, L.L. da. **Estudo genético de populações caprinas locais e exóticas através de marcadores microssatélites**. 2009. 151f. Tese (Doutorado integrado em Zootecnia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará e Universidade Federal da Paraíba, Recife, 2009.

ROGERS, J.B. **Measures of genetic similarity and genetic distance**. En : Studies in Genetics VII. University of Texas Publication 7213, p. 145-153, 1972.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for windows and linux. **Molecular Ecology Resources**, v.8 p.103-106, 2008.

SAHAI, R.; VIJH, R. K. **Domestic animal diversity - conservation & sustainable development**. Karnal: SI Publications, 2000. 355p.

SAINUDIIN, R., et al. Microsatellite mutation models: insights from a comparison of humans and chimpanzees. **Genetics**, v. 108, p.383-395, 2004.

SAITBEKOBA, N., C. et al. Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. **Animal Genetics**. v.30, p36-41, 1999.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite marker. **Molecular Letters**, v.9, p.615-629, 2006.

SIMONSEN, R.C. **O Ciclo da Mineração**. In _____ História Econômica do Brasil: 1500-1820. 5a. ed. Vol 100a, 1937.

SKAL, R.R. e MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Sci. Bull.**, 28: 1409-1438, 1958.

SOULSBURY, C.D.; IOSSA, G.; EDWARDS, K.J. The influence of evolutionary distance between cross-species microsatellites and primer base-pair composition on allelic dropout rates. **Conservation Genetics**, v.10, p.797-802, 2009.

SOUNDIS, J. e KRIMBAS, C. Accuracy of phylogenetic trees estimated from DNA sequence data. **Mol Biol Evol**, 4: 159-166, 1987.

SPRITZE, A.L. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageado por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1157-64, 2003.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, v.15, p. 199-203, 2000.

TAETENO, Y., NEI, M. e TAJIMA, F. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data I. Distantly related species. **J Mol Evol**, 18: 387-404, 1982.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

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

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. Estimating F-statistics for analysis of population structure. **Evolution**, v. 36, p. 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Population**. Vol 4. Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.

WRIGHT, S. **The theory of gene frequencies II.** Ed. The University of Chicago press. 511p, 1969.