

GLÍCA MARIA DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA PÉ-DURO UTILIZANDO
MICROSSATÉLITES ANCORADOS**

TERESINA, 2008

GLÍCIA MARIA DE ALMEIDA
Bióloga

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA PÉ-DURO UTILIZANDO
MICROSSATELITES ANCORADOS**

Dissertação apresentada em programa de Pós-graduação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de concentração: Melhoramento Genético e Produção de Animais de Interesse Econômico

TERESINA, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Orlane da Silva Maia – CRB3/915

| | |
|-------|---|
| A447e | <p>Almeida, Glícia Maria de. Caracterização genética dos bovinos da raça pé-duro utilizando marcadores moleculares ancorados / Glícia Maria de Almeida. – Teresina, 2008. 92 f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Raimundo Martins Filho. Co-Orientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias.</p> <p>1. Variação genética. 2. Raça nativa. 3. Marcador molecular.</p> <p>I. Título.</p> <p>CDD 636.2081 (21. ed.)</p> |
|-------|---|

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA PÉ-DURO UTILIZANDO
MICROSSATELITES ANCORADOS**

Glícia Maria de Almeida

Aprovado em 03/03/2008

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Raimundo Martins Filho – DCR/CCA/UFPI

Dr. Fábio Mendonça Diniz – Embrapa Meio-Norte

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

Dedico a Maria Martins dos Santos (in memoriam), pela grandeza de sua alma e a retidão de sua vida. Para mim exemplo de fé, determinação, amor e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

A Deus que já conhecia todos os meus caminhos quando ainda me formava no ventre de minha mãe e pelas infinitas bênção recebidas durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos tios *Zilmar e Izabel de Barros* que conduziram meus primeiros passos nessa longa jornada. Ensinado-me que o tesouro mais precioso de ser humano é o conhecimento.

A minha família, *José Almeida, Edna, Jesaias, Stéfani, Bianca e Júnior*, cujo auxílio e presença me ensinaram o real significado da palavra apoio e partilha.

Aos demais membros da família, tia *Baida*, tia *Preta*, tio *Preto*, tio *Sales*, *César Katiuce, Kelly, Kleven, Edson, Branco, Denise, Adrielle, Adrienne, Amarildo, Adeildo, Dora, Gilberto, Gabriel, Gliciane* que participaram direta e indiretamente para na minha formação.

Ao Doutor *Fábio Mendonça Diniz*, cuja orientação foi decisiva na consolidação de meus valores profissionais. Por todos os conselhos, correções, exigências e principalmente por ensinar-me sobre diligencia, objetividade, responsabilidade e dedicação.

Ao Doutor *Raimundo Martins Filho* pela orientação e compreensão, dando as palavras certas na hora certa. Por seu exemplo profissional e a participação em meu desenvolvimento científico.

Ao Doutor *Marcos Jacob de Oliveira Almeida* e *Geraldo Magela Cortes* pela amizade e apoio durante as varias etapas desse trabalho.

Ao Doutor *Paulo Sarmanho* pelo auxilio e colaboração diante de situações emergenciais no laboratório e nos diferentes momentos durante o desenvolvimento do experimento.

Ao Dr. *José Herculano de Carvalho* cuja participação e apoio foram fundamentais para que esse trabalho se concretizasse.

Aos membros da Associação Brasileira de Criadores de Pé-duro em nome do Presidente *Fernando Gayoso*, por incentivar o desenvolvimento desse trabalho.

Em nome de *José Dantas* e *Fernando Gayoso*, agradeço aos criadores de Pé-Duro, que acreditaram em nosso trabalho fornecendo as amostras para realizar esse trabalho.

A minha grande amiga *Joasy*, que além de colaborar na realização dos testes e seleção dos marcadores moleculares foi companheira durante as longas jornadas no laboratório.

Ao amigo *Disraeli* por todos os conselhos e ajuda.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia, *Cíntia*, *Geice*, *Joubert*, *Michelle*, *Adilana*, *Marcinho*, *Lorena*, *Sully*, *Marla*, *David*, *Ricardo* e *Lilia*.

Ao amigo *Fabio Britto* por me emprestar sua bicicleta viabilizando minha maior permanência no laboratório e principalmente por realizar as análises estatísticas da pesquisa.

Aos amigos *Alécio, Arnon, Cláudia e Aderson* que compartilharam bons momentos da minha vida e colaboraram indiretamente com a realização desse trabalho, acrescentando humor, alegria, serenidade, paz e ajudando diante das dificuldades.

A minha grande amiga *Adriana Lopes*, pela confiança, bom animo, ajuda apoio e colaboração desde os anos de graduação.

Aos amigos, *Aldo Jean e Lisânia*, que apoiaram e compartilharam as dificuldades e as vitórias.

Aos funcionários das Fazendas Faveira, Tucaia, Convencido e Octavio Domingos por ajudar-me durante as coletas das coletas.

Ao coordenador do Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, Professor *Assis* por colaborar na solução dos problemas burocráticos.

Ao secretario da Pós-Graduação, *Luiz* que direcionou as tomadas de decisão e ajudou na resolução de muitos problemas.

A professora Doutora *Francisca Lucia de Lima* por sempre acreditar no meu potencial produtivo, pela orientação e amizade durante a graduação e por me incentivar na pesquisa.

As professoras, *Socorro Meireles, Tânia, Maria de Socorro, Soares, Gardênia, Diva Amélia* que participaram da minha formação durante a graduação.

A professora Doutora *Adriana Mello de Araújo* por auxiliar em todos os momentos, pela atenção e os ensinamentos sobre Genética Animal e Biologia Molecular.

Aos professores do mestrado, *Elivalto, Hamilton Raposos, Daniele, Miguel, João Batista, Ivan, Fernando Aécio e Emerson* que contribuíram com a minha formação profissional.

A professora *Maria de Lordes*, pela amizade, conselhos e exemplo de dedicação.

Ao Dr. *Valdenir* por ajudar na compreensão dos resultados e análises estatísticas.

Ao estimado Dr. *Seiji Nakayama* por todo exemplo de vida, dedicação ao próximo e disciplina de vida.

Ao amigo e irmão *Vicente* que nos ofereceu o melhor cafezinho da Pós-Graduação.

Ao estimado amigo *Napoleão*, chefe geral da Embrapa Algodão, por suas sábias instruções e estímulo nessa jornada rumo à pesquisa.

Ao *Lucio Madeiros* por acreditar em meu potencial profissional.

A *Orlane*, bibliotecária da Embrapa Meio-Norte, que também contribuiu para realização deste trabalho.

Aos seguranças da Embrapa Meio-Norte, *Fábio Alves, Fábio Costa, Osmari, Gilvan Rocha, Laurindo, Luiz Carlos, Vanderlei Cardoso e Manuel Moura*.

Aos amigos de pós-graduação *Castelo, Luiz Segundo, Lidiana, Maxwell, Tatianne, Bruno, Luciana, Laí, Danilo, Felipe e Rodrigo* pela amizade.

Aos amigos novos amigos *Carlos e Vinicius* pela colaboração na realização de passos importantes para conclusão do trabalho.

Ao amigo *Alexandre Marcolino* por me ensinar que na vida é preciso unir forças para vencer.

Ao *povo brasileiro* que contribuiu com seus impostos viabilizando o apoio financeiro para dedicação a esse trabalho, através da bolsa concedida pela CAPES.

Ao Banco do Nordeste pelo financiamento que permitiu a realização dessa pesquisa.

“A grandeza de uma profissão é, antes de tudo, unir os homens; só há um luxo verdadeiro, o das relações humanas. Trabalhando apenas pelos bens materiais construímos nós mesmos nossa prisão. Encerramo-nos lá dentro, solitários, com nossas moedas de cinza que não pode ser trocadas por coisa alguma que valha a pena viver.”

Saint Exupéry

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 2.1. | Bovinos da Raça Pé-Duro..... | 23 |
| 2.2 | História e Importância Econômica da Raça Pé-Duro..... | 29 |
| 2.3. | Marcadores Moleculares..... | 31 |
| 2.3.1 | Microsatélites..... | 35 |
| 2.3.2 | Microsatélites Ancorados | 37 |
| 3. | REFERÊNCIAS | 40 |
| 4. | CAPITULO I..... | 49 |
| 4.1 | Resumo..... | 50 |
| 4.2 | Introdução..... | 50 |
| 4.3 | Material e Métodos..... | 53 |
| 4.3.1 | Coleta de Material..... | 53 |
| 4.3.2 | Protocolos de extração de DNA..... | 54 |
| 4.3.3 | Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese | 55 |
| 4.3.4 | Avaliação do tempo de extração | 56 |
| 4.3.5 | Avaliação da Segurança dos Protocolos..... | 57 |
| 4.3.6 | Avaliação da Quantidade de DNA..... | 56 |
| 4.4 | Resultados e Discussão | 56 |
| 4.6. | Conclusão | 60 |
| 4.7 | Referências..... | 61 |

| | |
|---|----|
| 5. CAPITULO II | 63 |
| 5.1 Resumo..... | 64 |
| 5.2 Introdução | 65 |
| 5.3 Material e Método..... | 68 |
| 5.3.1 Coleta das amostras..... | 68 |
| 5.3.2 Extração de DNA de bulbos pilosos | 69 |
| 5.3.3. Seleção de marcadores moleculares | 69 |
| 5.3.4 Perfil da PCR para microssatélite ancorado..... | 70 |
| 5.3.5 Eletroforese..... | 71 |
| 5.3.6 Análise Estatística..... | 72 |
| 5.4 Resultados e Discussão..... | 72 |
| 5.5 Conclusão..... | 83 |
| 5.6 Referências | 84 |
| 6. Considerações finais..... | 85 |
| 7. ANEXOS | 89 |

Resumo

O melhoramento genético animal no Brasil obteve resultados interessantes sobre o ganho genético dos animais domésticos, principalmente a seleção assistida por marcadores moleculares. A produção animal realizada pelo sistema clássico de melhoramento permitiu um aumento significativo sobre o ganho genético dos animais. Porém, este pode ser mais significativo com uso de técnicas e ferramentas da Biologia Molecular para seleção e preservação de animais. Eles possuem genes de grande importância ao melhoramento genético e de modo geral estão em risco de extinção. A raça Pé-Duro é um exemplo de raça nativa brasileira sobre a qual são conhecidos apenas dados parciais sobre sua população. Sabe-se que existe um pequeno número de animais distribuídos na Região Nordeste, concentrando-se principalmente no Estado do Piauí onde está localizado o núcleo de conservação da raça. No presente trabalho priorizou-se a obtenção de material genético por métodos práticos e economicamente viáveis. Foram testados protocolos não-invasivos para a extração de DNA genômico, selecionando-se e otimizando-se marcadores moleculares microssatélites ancorados (ISSRs) para caracterização e avaliação da diversidade genética e estrutura populacional da raça Pé-Duro. Avaliaram-se os protocolos CTAB, Chelex[®]100 e Chelex[®]100 com Proteinase K quanto ao tempo, segurança e quantidade de DNA extraído. O protocolo Chelex100 com proteinase apesar de requerer mais tempo, foi o que extraiu mais DNA, sendo um protocolo bastante seguro para manipulação. Ao extrair o material genético de 364 animais da raça Pé-Duro e utilizar os marcadores moleculares ISSRs definiu-se a estrutura genética e a variabilidade das populações. Utilizou-se os programas estatísticos ALERQUIN e HICKORY para análise genética das populações. Utilizou-se 29 primers de microssatélites ancorados dos quais 5 amplificaram bandas consistentes e

reprodutíveis aos mesmos loci em 74 animais, produzindo 55 *loci* polimórficos. Os fragmentos amplificados correspondem as bandas com tamanhos variáveis entre 1900pb (UBC-895) e 300pb (UBC-886). Com a AMOVA obteve-se os seguintes resultados de variabilidade genética entre grupos 20.24%, entre populações dentro de grupos 21.59% e entre populações 58.17%. O dendograma obtido pela análise de Cluster baseada no coeficiente de similaridade Jaccard corroborou para confirmação dos dados apresentados pela análise de variância molecular (AMOVA). As populações da raça Pé-Duro analisadas com marcadores microssatélites ancorados possuem variabilidade genética distinta e poderão ser utilizadas em programas de melhoramento genético de outras raças.

Palavras-chave: diversidade genética, marcadores moleculares, ISSR, raça nativa,

Abstract

The breed's genetic improvement had interesting results concerning to genetic gain for animals in Brazil, mainly the assisted selection using molecular markers. The animal production, achieved through the classic improvement system, allowed a significant rise of the animal genetic gain. The state of Piauí, in the Northeast region of Brazil, is where can be found the most significant number of a native cattle named Pé-Duro that has important genes for breed improvement. It is in risk of extinction and information such as its general number and the farms where these bovines stay are not well-known. There is already a nucleus for genetic preservation of the Pé-Duro. The molecular biology techniques and tools used to select and preserve native animals can provide reliable results to increase breed improvement. In this work, one priority was to obtain genetic material using simple and inexpensive method. The aim was to test non-invasive protocols to extract DNA, selecting and optimizing the molecular markers ISSRs (Inter Sequence Simple Repeats) and SSR (Sequence Simple Repeats) to characterize the Pé-Duro cattle and to analyze its genetic diversity and the structure of its population. The protocols CTAB, Chelex[®]100 and Chelex[®]100 with K proteins were evaluated on the subject of time, security and quantities of DNA. The Chelex100 with K proteins protocol was the most trustworthy and the one that provided sufficient DNA. Material from 364 animals was collected to extract DNA where was applied the ISSR to define the genetic structure and diversity. The statistic analysis was supported by ALERQUIN and HICKORY systems. Out of the 29 primers of Inter Sequence Simple Repeats, just 5 amplified consistent and reproducible fragments per loci in 74 animals gave 55 polymorphic *loci*. The amplified fragments have size between 1900pb (UBC-895) and 300pb (UBC-886). The results of AMOVA showed a genetic

variation within groups of 20.24%. Between populations and the groups the result was 21.59%. And between populations it was 58.17%. The dendogram obtained by Cluster analyses confirm AMOVA data. The breeds of Pé-Duro analyzed with ISSR have distinct genetic diversity and can be used for others breed improvement programs.

Keys-word: genetic diversity, molecular markers, ISSR, native cattle.

1. INTRODUÇÃO

Selecionar animais com alto potencial gênico sempre foi um desafio. Nossos ancestrais selecionavam animais de modo empírico baseados nas observações e avaliações das características relacionadas aos fenótipos de produção e nem sempre conseguiam os resultados que almejavam. Atualmente, o melhoramento genético animal no Brasil obteve resultados positivos sobre o ganho genético dos animais domésticos, principalmente com a seleção assistida por marcadores moleculares, importante ferramenta da Biologia Molecular.

Definir qual o percentual da participação dos genes e do ambiente na expressão de um fenótipo animal, até os dias de hoje é uma tarefa difícil, principalmente as características que resultam da ação de vários genes. Pois, os fenótipos são resultado da expressão do conjunto gênico e de sua interação com fatores ambientais. Porém, os conhecimentos genéticos e o desenvolvimento de tecnologias da Biologia Molecular têm contribuído para identificação correta dos fenótipos de interesse econômico (PEREIRA, 1999).

A produção animal dirigida pelo sistema clássico de melhoramento permitiu um aumento significativo sobre o ganho genético dos animais no Brasil. A produção brasileira de leite, por exemplo, aumentou em 9,88% (CEPEA, 2007) no ano de 2007, resultado da máxima expressão genética favorecida por um manejo adequado, uma alimentação e efeitos ambientais. No entanto, os animais domésticos têm apresentado ganhos genéticos superiores nos países desenvolvidos onde as ferramentas da Biologia Molecular são mais acessíveis (REGITANO e COUTINHO, 2001).

Sabe-se que a pecuária é uma atividade secular no Brasil e até os dias de hoje, mantém-se como uma atividade de grande expressão econômica. Iniciou-se no governo de

Tomé de Sousa e teve grande importância no delineamento da economia colonial, viabilizando a colonização e o desenvolvimento do interior do Brasil colonial. Os bovinos foram um dos elementos usados para obtenção de terras, além de servir como força de trabalho nos engenhos e no cultivo da cana-de-açúcar (NASCIMENTO, 2003).

Os principais pontos de entrada de bovinos no Brasil, durante o período colonial, foram os Portos de Olinda, Salvador e São Vicente, atual estado de São Paulo. A partir desses três locais os bovinos, trazido pelos portugueses, começaram o povoamento dos campos naturais do Brasil e por seleção natural formaram grandes rebanhos que originaram diversas raças bovinas que atualmente já estão melhoradas para algumas características de interesse econômico (CAMARGO, 1990; BRITTO, 1998) e outras raças em risco de extinção, a exemplo tem-se a raça Pé-Duro.

De acordo com ATHANASSOF (1957) e NOGUEIRA NETO (1980), os bovinos introduzidos no Brasil no século XVI pertenciam a três troncos: *Bos taurus ibericus*, *Bos taurus aquitanicus* e *Bos taurus batavicus* e todos constituíam as raças Ibéricas. Santiago citado por Carvalho et al.(2001) afirma que o gado Pé-Duro formou-se no norte do Brasil, especialmente na Região Nordeste e no Vale do São Francisco de onde migraram para os campos de Minas Gerais e Goiás.

A raça Pé-Duro é um exemplo de raça nativa brasileira sobre a qual são conhecidos apenas dados parciais sobre sua população. Sabe-se que existe um pequeno número de animais distribuídos na Região Nordeste, concentrando-se principalmente no Estado do Piauí onde está localizado o núcleo de conservação da raça.

O projeto é coordenado por uma equipe de pesquisadores da Embrapa Meio-Norte na Fazenda Experimental Octavio Domingues, em São João do Piauí. De acordo com a Sociedade Brasileira de Criadores de Pé-Duro (SBPD) há um total de 1519 bovinos da raça

Pé-Duro distribuídos na Paraíba, Maranhão e Piauí, onde se concentra o maior número dos animais.

O objetivo em conservar a raça Pé-Duro possui varias justificativas entre elas destacam se a contribuição que esses animais tiveram no desenvolvimento do Estado do Piauí e por sua efetiva participação no processo de colonização, formação cultura e econômica. Além dos legados históricos, outra forte razão para conservar esta raça é seu iminente potencial para produção de carne orgânica, pois a notável resistência a parasitas confere a menor utilização de medicamentos (EMBRAPA, 2006).

A raça Pé-Duro é um recurso genético brasileiro, possuem um conjunto gênico distinto sendo responsável pela adaptação e sobrevivência dos animais em Ecossistema de Caatinga. Assim, a criação de bovinos Pé-Duros ou de seus mestiços mostra-se promissora para atividade agropecuária que poderá aproveitar as pastagens naturais de baixa qualidade, especialmente na zona semi-árida do Nordeste Brasileiro (CARVALHO, 1985; CARVALHO et al., 2002) assumindo grande importância econômica.

Além de preservar é importante estabelecer a origem e a diversidade genética das raças adaptadas, o que pode ser feito por meio de marcadores moleculares. Atualmente existem diversos tipos de marcadores, os quais utilizados de acordo com sua adequação aos objetivos propostos em estudo de Genética e de Melhoramento Animal. Do mesmo modo, existem diferentes métodos de obtenção de DNA, estabelecidos em protocolos que variam quanto ao tempo, segurança e diferentes tecidos para obtenção de material genético que podem ser invasivos ou não-invasivos.

No presente trabalho priorizou-se a obtenção de material genético por métodos práticos e economicamente viáveis. Testando-se protocolos não-invasivos para a extração de DNA genômico, selecionando-se e otimizando-se marcadores moleculares

microssatélites e microssatélites ancorados (ISSRs) para caracterização da raça Pé-Duro e avaliação da diversidade genética e estrutura populacional.

Este trabalho está estruturado em Introdução, Revisão de Literatura e dois capítulos na forma de artigos científicos. No primeiro capítulo avalia-se a eficiência dos protocolos de extração de DNA por métodos não-invasivos. São avaliados e discutidos três protocolos quanto à eficiência de material extraído e segurança na manipulação da técnica. Os aspectos mercadológicos para extração não compõem esse estudo, uma vez que outros autores já comprovaram o baixo custo e acessibilidade para extração de DNA, principalmente os protocolos baseados na resina Chelex®.

O segundo capítulo compreende a seleção e a otimização dos marcadores moleculares microssatélites de DNA e microssatélites ancorados para caracterização da raça Pé-Duro e avaliação da diversidade genética. As variáveis avaliadas foram: temperaturas de anelamento dos primers e a concentração dos reagentes utilizados na PCR (Reação em Cadeia da polimerase) para amplificação dos segmentos do genoma bovino através dos painéis de marcadores selecionados. Obteve-se uma visão parcial da diversidade genética e estrutura populacional da raça utilizando os microssatélites ancorados que ainda não foram utilizados em estudos com bovinos da raça Pé-duro.

Os capítulos são apresentados no formato de artigo científico, com Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Keywords; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências Bibliográficas em conformidade com as normas de publicação dos periódicos selecionados.

O primeiro capítulo segue as normas da Revista Biotechnology (ISSN: 1682-296X) e parte do segundo que está condensado em dois artigos, segue as normas da Revista Brasileira de Zootecnia (ISSN:1516-359X) da Sociedade Brasileira de Zootecnia para um

artigo que está condensado no segundo capítulo. A outra parte do segundo capítulo compõe um terceiro artigo escrito segundo as normas da Genetics and Molecular Biology (ISSN: 1415-475X). A Revisão de Literatura será publicada como artigo na Série Documentos (Periódicos, ISSN: 0104-866X) da Embrapa Meio-Norte.

2. Revisão de Literatura

2.1. Bovinos da Raça Pé-Duro

Raças nativas originam-se por processos de especiação que não foram concluídos. Quando uma espécie sofre seleção natural, várias pressões atuam sobre o conjunto gênico ancestral que ao longo do tempo resulta em populações com características morfológicas, fisiológicas e comportamentais distintas até se adaptarem as condições ambientais de um determinado ecossistema.

A seleção, a recombinação gênica e as mutações conduzem o processo evolutivo permitindo a origem de novas espécies. Porém, as características existentes entre as populações que se segregam continuam similares até que o processo de especiação se complete. Porém, enquanto as populações divergentes mantiverem fluxo gênico e sucesso reprodutivo, serão classificadas como raças (GRIFFITHS et al., 2002).

Os bovinos são exemplos clássicos de especiação incompleta. As raças bovinas brasileiras formaram-se através da seleção natural sobre o conjunto gênico de animais ancestrais originários da Europa. Eles foram expostos a condições climáticas e biológicas das diferentes regiões brasileiras e passaram a expressar fenótipos adequados aos seus ambientes específicos. Essas adaptações surgiram como resposta às pressões seletivas que favoreceram a expressão dos genes responsáveis pela sobrevivência nesses ambientes (PEREIRA, 1999).

Na América do Sul as raças nativas de bovino se formaram a partir de vários rebanhos trazidos por colonizadores portugueses e espanhóis (CARVALHO, 1981; CARVALHO, 1985; MARIANTE e CAVALCANTE, 2000), uma vez que esses animais não existiam no continente Americano. Porém, a participação dos espanhóis na formação das raças nativas de bovinos brasileiros é controversa. Historicamente sabe-se que as influências da colonização espanhola, segundo relatos históricos, ficaram concentradas na América Central e porção ocidental da América do Sul. No Brasil, a atuação espanhola foi limitada pelo Tratado de Tordesilhas e segundo ATHANASSOF (1957), este foi o único país da América do Sul a receber gado de origem portuguesa.

A participação desses animais no desenvolvimento sócio-cultural e econômico da sociedade brasileira foi impactante e notória. Durante o período da colonização brasileira os

bovinos foram usados como alimento, força de trabalho, matéria-prima e ainda contribuíram com o processo de povoamento do interior brasileiro.

Nos primeiros anos de colonização os bovinos foram usados na produção açucareira arando a terra e movendo os engenhos até que as terras férteis do litoral destinadas ao cultivo da cana-de-açúcar foram ameaçadas pela atividade pecuarista que necessitava das pastagens para sustentar o gado. Com isso, os animais adentraram os sertões em busca de espaço para sobreviver, desencadeando o processo de povoamento dos campos naturais do Brasil, à medida que iam se adaptando às diferenças ambientais e constituindo os grandes rebanhos de gado denominados “crioulos” (SANTIAGO, 1975; CAMARGO, 1990).

Os rebanhos crioulos diversificaram-se e deram origem às diferentes raças nativas, entre as quais se destacam a raça Crioula Lageana adaptada às variações climáticas de frio e calor na Região Sul (RIBEIRO, 1993), a raça Mocho Nacional na Região Centro-Oeste (ROSA, 1992) e a raça Pé-Duro adaptada às condições do semi-árido na Região Nordeste (CARVALHO, 1981; BRITTO, 1987; BRITTO, 1998).

Esses rebanhos ancestrais lentamente passaram a expressar características e adquiriram uma identidade racial apresentando características fenotípicas adequadas à sobrevivência aos diferentes biomas brasileiros. Atualmente, algumas dessas raças participam ativamente da produção agropecuária tendo sido melhoradas geneticamente para características de interesse econômico (SANTIAGO, 1975; CAMARGO, 1990; PRIMO, 1992; BRITTO, 1998).

Segundo ATHANASSOF (1957), a raça Pé-Duro originou-se a partir do tronco étnico *Bos taurus ibericus*, ao qual pertenciam as raças ibéricas Alentaja, Galega e Mirandesa. A raça Pé-Duro formou-se na região Nordeste, principalmente no Vale do São Francisco e depois se espalhou para outras regiões onde se tornaram conhecidas como raça Curraleira (Santiago citado por CARVALHO et al., 2001) e atualmente, apresentam diferenças fenotípicas como resultado das influências ambientais do ecossistema de Caatinga.

DOMINGUES et al. (1956) sugeriram padrões provisórios para seleção da raça Pé-Duro esclarecendo que esses padrões poderão ser modificados de acordo com as necessidades sugeridas. Estes autores recomendam que os animais sejam selecionados tendo em vista sua resistência e adaptação ao meio e sugerem altura e peso mínimos respectivamente, de 1,24 m e 380 kg para machos e 1,38m e 300kg para fêmeas. Além

disso, fornecem dados sobre conformação da cabeça que é pequena com perfil sub-côncavo, chifres curtos, orelhas pequenas, boca grande, ventas largas, pescoço fino, barbela, umbigos reduzidos, ausência de cupim, vassoura preta, membros delgados e pelagem variada. Esses padrões citados podem ser visualizados nas figuras 1 e 2, nas quais podem ser observadas, bovinos Pés-Duros pertencentes ao rebanho da Embrapa Meio-Norte no município de São João do Piauí.

Além do perfil morfológico da raça, CARVALHO (1981) destaca que características etológicas como rusticidade e docilidade são marcantes no gado Pé-duro. O autor ainda afirma que essas características poderiam ser utilizadas em programas de melhoramento genético permitindo a exploração econômica das raças que possuam menor resistência térmica e expressem comportamentos menos docéis, isso, facilitaria o manejo e estimularia a pecuária em regiões de clima semi-árido.



Figura 1. Touro do núcleo de Conservação da Fazenda Experimental Octavio Domingues, Embrapa Meio-Norte.

A raça Pé-Duro foi criada nas pastagens naturais do Sertão Nordestino com mínimos cuidados sanitários e alimentação de pouca qualidade nutricional (CARVALHO e AMORIM et al., 1989) expressando características de extrema rusticidade que se refletiram na constituição robusta, forte e ligeira (NASCIMENTO, 2003).

Esses bovinos tornaram-se recurso genético, uma vez que devem possuir genes únicos de grande potencial econômico à pecuária brasileira que seria responsável pela expressão dos fenótipos de resistência térmica, imunológica e deficiência nutricional garantindo a sobrevivência desses animais dentro das condições ambientais inviáveis às raças comerciais exploradas atualmente MARTÍN-BURRIEL et al. (1999)

Para CARVALHO (1984), a utilização da raça Pé-Duro em programas de melhoramento genético é fundamental. Porém, faz-se necessário que os animais sejam conservados e avaliados molecularmente para que suas características adaptativas possam ser utilizadas na formação de um banco de informações genéticas (BRITTO, 1995) que auxiliem na seleção dos animais e na gestão dos rebanhos.

Acredita-se que o conhecimento sobre a diversidade genética e a estrutura da população da raça Pé-Duro promoveria um desenvolvimento significativo para pecuária brasileira, especialmente para produção em região de Semi-Árido. Pois, além de estarem adaptados, requerem baixos investimentos o que favorece a criação pelo pequeno produtor rural.

A produção de leite e carne a partir dos rebanhos Pés-Duros seria de baixo custo, uma vez que não se faz necessário investimento em grande infra-estrutura para criá-los. Posteriormente, poderiam ser inclusos em programas de melhoramento para produção de carne orgânica, pois apresentam alta resistência a parasitas e microorganismos o que reduz a utilização de medicamentos (EMBRAPA, 2006).

Os rebanhos de bovinos nativo constituíram a base da pecuária na América do Sul, embora a maioria das raças encontra-se em risco de extinção por causa de cruzamentos absorvente utilizando raças exóticas como as Zebuínas. Os criadores nordestinos acreditavam que melhoramento dos animais resultantes dos cruzamentos dos animais nativos com os animais exóticos se dava pelo material genético exógeno. O quê acabou por subjugar o potencial genético das raças nativas que eram consideradas inferiores (CAMARGO, 1990).

Até o momento, não se conhece adequadamente o valor genético nem o potencial zootécnico da raça Pé-Duro. E a extinção do gado nativo representará uma perda irreparável à pecuária nacional considerando que genes de interesse econômico que poderiam ser utilizados pelo melhoramento genético, tais como, os genes de resistência a doenças e as altas temperatura (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000), desapareçam da população.

O processo de extinção da raça Pé-Duro começou com a introdução da raça Zebu, que aos poucos foi substituindo o gado nativo por meio da castração de machos e cruzamentos das fêmeas Pé-Duros por reprodutores Zebu (CARVALHO, 1985; BRITTO, 1998). Os rebanhos da raça Pé-duro foram gradualmente modificando constituindo-se por um grande número de animais mestiços, ou seja, sem raça definida resultantes dos cruzamentos seletivos e não sistemáticos entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Por não estarem adaptados às condições climáticas da Caatinga, os mestiços tiveram suas características de produção comprometidas, além de baixa resistência e conseqüentemente maiores problemas sanitários (BRITTO, 1998).

Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Pé-Duro há 1519 animais dessa raça distribuídos entre os Estados do Maranhão, Paraíba e Piauí, sendo que neste último encontra-se em maior número e ampla distribuição. Porém, alguns criadores ainda vêem os bovinos Pé-Duros como animais de baixo padrão zootécnico e essa concepção tem dificultado as estratégias de conservação, pois continuam estimulando a formação de mestiços. CARVALHO (1983) e BRITTO (1998) confirmam a predominância das populações de Pé-Duros no Estado do Piauí, porém BRITTO (1998) ressalta a existência de um significativo número de mestiços dentro dessas populações.

A iniciativa do Dr. José Herculano de Carvalho, pesquisador da Embrapa Meio-Norte, foi notória e eficiente para manutenção da raça Pé-Duro através de um programa de conservação situado na Fazenda Experimental Octavio Domingues, em São João do Piauí, iniciando o projeto em 1983 com 10 touros e 25 vacas. Na figura 2 pode se visualizar alguns dos animais que constituem o atual rebanho de conservação.

O núcleo de preservação da raça Pé-Duro é responsabilidade da equipe de pesquisadores da Embrapa Meio-Norte e faz parte do projeto “Coleções Biológicas”, coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

O gado tem sido criado em sistema extensivo em pastagens naturais no Bioma da Caatinga com poucas interferências humanas, especialmente sobre os acasalamentos e alimentação.

Material genético e células gaméticas da raça Pé-Duro têm sido coletados para preservação, constituindo parte do projeto Coleções Biológicas. Esse material será utilizado para desenvolver trabalhos com inseminação artificial, formação de banco de germoplasma e caracterização genética. Esses procedimentos servirão para definir manejo genético, selecionar animais para melhoramento e colaborando com o iminente desenvolvimento agropecuário em função da participação desta raça.



FIGURA 2. Grupo de animais do rebanho do núcleo de conservação da Fazenda Experimental Octavio Domingues, Embrapa Meio-Norte.

2.2 História e Importância Econômica da Raça Pé-Duro

Os primeiros bovinos chegaram ao Brasil em 1534. Desembarcaram no porto de São Vicente (LIMA et al. 1990) e posteriormente em Pernambuco e litoral da Bahia (MARIANTE, 1993). A priori, os bovinos serviram como alimento e força de trabalho movimentando os engenhos e arando a terra (BRITTO, 1995), participaram diretamente para abertura dos caminhos que conduziam ao sertão brasileiro contribuindo com o processo de colonização do interior do Brasil (NASCIMENTO, 2003).

Os bovinos introduzidos pelos colonizadores portugueses no Brasil pertenciam a três troncos étnicos: *Bos taurus ibericus*, *Bos taurus aquitanicus* e *Bos taurus batavicus* (NOGUEIRA-NETO, 1980; CARVALHO e PEREIRA, 1981). Dentro desses grupos taxonômicos encontravam-se todas as raças de bovinos existentes na Península Ibérica durante o século XV.

Atualmente em Portugal, os bovinos do tronco *ibericus* constituem-se pelas raças Barrosã, Mirandesa, Minhota, Alentejana e Arouquesa que provavelmente participaram da constituição genética das raças de bovinos brasileiros (MARIANTE e CAVALCANTE et al., 2000), bem como da raça Pé-Duro, ainda no período da colonização brasileira.

Nos primeiros anos de colonização, ABREU (1954) nos afirma que o gado era criado na faixa litorânea servindo para alimentar os colonos e para movimentar os engenhos de cana-de-açúcar. E com o passar do tempo, os rebanhos foram crescendo e começaram a competir pelas mesmas terras destinadas ao cultivo da cana. Isso se tornou um problema socioeconômico, pois, a agricultura exigia as melhores e mais estratégicas terras para cultivo e exportação do açúcar e os rebanhos ainda não tinham expressão econômica para requerer as terras férteis do litoral. Assim, elaborou-se um Decreto real que proibia a criação de gado nessas faixas de terra. E a consequência direta dessa proibição foi à ocupação das terras ainda não colonizadas e exploradas economicamente.

NASCIMENTO (2003) afirma que Garcia D'Ávila foi o pioneiro na criação de gado no sertão baiano. Ele se tornou o maior latifundiário da história colonial do Brasil e suas atividades agropastoris inauguraram em 1552 o ciclo econômico da pecuária na região Nordeste. Ele realizou a primeira comercialização de bovinos com a Corte Portuguesa.

O Brasil colonial foi dividido em lote de terras que foram denominados de Sesmarias. Esses lotes de terra com o tempo se tornaram verdadeiros latifúndios e culminaram nos problemas agrários que permanecem até os dias de hoje. As terras eram concedidas mediante algumas justificativas, entre elas estavam: o cultivo da cana-de-açúcar e a criação do gado. O latifúndio de maior expressão histórica pertenceu a família D'Ávila e ficou conhecido por "Casa da Torre". As extensões territoriais da família D'Ávila estendiam-se por quase toda região Nordeste (ABREU, 1954) e para dominar essa proporção colossal de terras os D' Ávilas contavam com assessoria do amigo Domingos Afonso Mafrense.

Segundo NASCIMENTO (2003), Domingos Afonso Mafrense instalou várias fazendas de gado à medida que adentrava no sertão nordestino com os rebanhos. Ele iniciou essa trajetória no vale do rio São Francisco. E à medida que prosseguia o curso dos rios conduzindo o gado proveniente do núcleo da Bahia, ocupava as regiões do rio Canindé, Tranqueiras, Piauí e Gurguéia. E dessa forma, foi o responsável pela colonização do Estado do Piauí.

Para ABREU (1954), as fazendas surgiram como conseqüência dos famosos "currais de dentro", construções simples para descanso e manutenção dos animais durante a viagem. Em torno desses currais formaram-se núcleos de povoamento que prosperaram e originaram várias cidades, entre as quais se destaca a cidade de Oeiras, a primeira capital do Estado do Piauí.

Os bovinos chegaram ao Piauí em 1674, consolidando o povoamento, promovendo o desenvolvimento econômico principalmente com o comércio de charque e couro. A atividade pecuária no Piauí se tornou tão lucrativa a ponto de atrair Domingos Dias da Silva. Ele deixou suas terras no Rio Grande do Sul para fundar indústria de charque no Piauí e exportou o produto para a Bahia, Pernambuco, Maranhão, Pará e ocasionalmente para o Rio de Janeiro (ABREU, 1954; BRITTO, 1998).

No período colonial, a economia brasileira fundamentou-se no cultivo da cana-de-açúcar que era realizado no litoral e na criação e comércio de gado que era atividade própria do interior brasileiro. Os criadores por muito tempo tiveram sucesso com atividade pastoril e foram autônomos social e economicamente, não dependendo da coroa para conduzir o desenvolvimento do sertão. Esse período de prosperidade pastoril na Região Nordeste ficou conhecido como a "civilização do couro" (ABREU, 1954; NASCIMENTO,

2003).

O apogeu da pecuária ocorreu com o comércio do couro. Na literatura, esse período foi relatado por ABREU (1954) através de uma listagem de objetos manufaturados com couro. Segundo este autor, com o couro eram feitas as portas das cabanas, o rude leito, a cama para partos, o recipiente para carregar água, o alforje, as cordas, as malas, os utensílios do vaqueiro, a bainha da faca, as roupas, a sela, o chicote, o chapéu, a mobília da casa. Evidenciando a importância do couro que, segundo BRITTO (1998) foi a matéria-prima que garantiu dois séculos de tranquilidade econômica ao Estado do Piauí.

NASCIMENTO (2003) acredita que o declínio da pecuária nordestina foi em consequência das secas nos anos de 1745-1746 e 1748-1751 quando a exportação de couro diminuiu significativamente na Paraíba, Rio Grande do Norte e Pernambuco. Nesse mesmo período, o Estado do Ceará tentou recompor seus rebanhos adquirindo gado do Piauí. Porém, os rebanhos nordestinos não resistiram à seca de 1791/93 e a pecuária piauiense também declinou.

Os poucos animais que sobreviveram a essas secas deram origem a raça Pé-Duro. O gado se adaptou às condições inóspitas do semi-árido sendo criados sem qualquer tipo de manejo. E a natureza colaborou com formação e definição da raça Pé-Duro através das pressões ambientais, ou seja, a seleção natural. Mas, esses animais participaram ativamente do desenvolvimento econômico do Nordeste, especialmente do Piauí, antes de se tornarem reduzidos e esquecidos com o passar da história.

Atualmente, a raça Pé-Duro é mais que uma população de bovinos nativos que resistiu às intempéries físicas, sociais e culturais. Eles são patrimônio histórico, biológico e genético, pois participaram da construção do Estado do Piauí; compõe uma unidade ecológica e reprodutiva dentro da família *Bovidae*; e possuem genes que expressam características de resistência que os permitiu sobreviver no Bioma de Caatinga.

O potencial produtivo da raça Pé-Duro foi subjugado. Mas, acredita-se que em breve, esses animais possam contribuir para o desenvolvimento da pecuária nacional. Através do melhoramento genético de outras raças e viabilizando a expansão da produção animal na região Semi-Árida.

2.3. Marcadores Moleculares

Marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, ou de um segmento específico de DNA não expresso. Correspondem a pontos de referência nos cromossomos, ou seja, seqüências de nucleotídeos na estrutura do material genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Algumas seqüências de nucleotídeos na molécula de DNA são reconhecidas como marcas moleculares ou pontos físicos denominados de “*loci*”. Estes podem ser determinados e analisados por técnicas da Biologia Molecular para identificar as variações no genoma dos animais (CHAVES, 2007).

Os primeiros marcadores utilizados para o melhoramento genético foram os marcadores morfológicos. Segundo FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998), esses marcadores foram amplamente empregados para o melhoramento genético até a década de sessenta. Anos depois, os melhoristas começaram a utilizar marcadores bioquímicos através do polimorfismo das proteínas de interesse econômico, a exemplo da caseína viável a mensuração do valor genético em bovinos (REGIANTO e COUTINHO, 2001). Os marcadores moleculares surgiram mais tarde e viabilizaram a identificação do genoma com maior precisão e segurança. Atualmente, existem diversos tipos de marcadores moleculares e cada marcador apresenta características específicas que estão adequadas a diversos trabalhos de Genética Animal.

Os marcadores morfológicos são pouco eficientes porque mensuram parcialmente o genoma. Avaliam apenas o conjunto gênico através dos genes funcionais que são expressos resultando nos fenótipos visíveis (CUNNIGHAM, 1990). Porém, a utilização dos marcadores moleculares possibilita análise mais eficiente do genoma não se limitando aos padrões mensuráveis e visualizados nos animais.

O uso dos marcadores moleculares na pecuária promoveu desenvolvimento genético dos animais domésticos. Justificada na segurança em determinar o potencial genético animal antes mesmo que seus fenótipos se expressem. Animais, ainda em período de desenvolvimento embrionário podem ter seu valor genético determinado não sendo necessário esperar a fase biologicamente produtiva ou de sua progênie para serem avaliados (REGITANO e COUTINHO, 2001).

Atualmente os marcadores moleculares são as ferramentas mais eficazes para estudos de Genética, especialmente para o melhoramento genético das espécies de interesse econômico. E ainda assumem papel importante nos programas de conservação “*in situ*” e “*ex situ*” de germoplasma de animal em vias de extinção. Geram informações genéticas que permitem compreender a história, a geografia e as relações ecológicas com outras espécies. Além de determinar o nível de consangüinidade, a estrutura e a diversidade genética das populações (MORITZ, 1994; HAIG, 1998; BARON, 2000).

Os resultados produzidos com uso de marcadores moleculares minimizam os erros de seleção animal decorrentes da influência ambiental sobre as características de interesse econômico, permitindo analisar a variação das características diretamente no genoma do indivíduo. Com isso isolam a interferência atópica e natural, uma vez que os fenótipos de produção resultam da expressão poligênica e da interação dos efeitos ambientais.

Marcadores moleculares têm sido utilizados para identificar genes de interesse econômico em bovinos, loci de características de interesse econômico (QTLs), identificação de paternidade, mapeamento genético, introgressão de genes úteis, estudos evolucionários, diagnóstico precoce de doenças e seleção assistida por marcadores (AMARANTE e WOMACK, 2004) e também para caracterizar geneticamente as populações nativas de bovinos (EGITO, 1995).

Os marcadores moleculares mais usados são RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic), AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism), minissatélites e microssatélites (Simple Sequence Repeats - SSR) (VALENTIM et al., 2003). Atualmente, se destacam os ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) denominados também microssatélites ancorados (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Os marcadores citados, exceto RFLP, são baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR-Polymarese Chain Reaction). Ferramenta Molecular que amplifica fragmentos de DNA viabilizando o conhecimento do genótipo dos indivíduos.

Marcadores moleculares RAPD tem sido utilizados na caracterização genética de raças nativas brasileiras, tais como, a raça Crioula Lageana (SPRITZE et al., 2003), a Caracu, a Mocha Nacional, a Curraleira (Pé-Duro), a Pantaneira, a Holandesa e a Nelore (SERRANO, 2001). Essas raças foram estudadas e a diversidade genética de suas populações foi mensurada confirmando a existência a alta variabilidade genética. Ao serem

comparadas com as raças exóticas e comerciais, as raças nativas realmente revelaram maior diversidade gênica e nisso consiste a necessidade de preservá-las e conservá-las.

A utilização de RAPD em rebanhos de bovinos espanhóis permitiu a definir a estrutura genética da população, a identificar uma baixa diversidade genética das raças, os problemas de fertilidade, a distância gênica entre as populações, contribuindo com o desenvolvimento de um programa de conservação para as raças estudadas (PAREJO et al., 2002).

Os RFLPs foram utilizados em estudos para diferentes raças bovinas como a Zebu (ROSA, 1997), Holandesa (DIETZ et al., 1997), Jersey (GILLIESPIE et al., 1999), Nelore (TAMBASCO et al., 2000), Crioula Argentina (GIOVAMBATTISTA et al., 2001), Gir (MOTA et al., 2002) e Japanese Black e Japanese Shorthorn (TAKESHIMA et al., 2003) permitindo diferenciar e determinar as distâncias genéticas de uma forma geral, além de gerar resultados significativos quanto às frequências alélicas do loco BoLA-DRB, relacionado a produção de leite, exceto para Nelore, cuja aplicação do RFLP determinou-as como diferentes populações, provendo base molecular para determinação de sua origem comum.

Marcadores microssatélites permitiram o desenvolvimento de mapas genéticos na espécie *Bos taurus* e *Bos indicus*. E mesmo apresentando grande potencial descritivo e alto nível de polimorfismo os microssatélites ancorados, ou ISSRs, têm sua aplicação mais expressiva em vegetais e animais de filos menos complexos, como os artrópodes, como pode ser verificado nos trabalhos de KANTETKY et al.(1995), BORNET e BRANCHARD (2001) e PAPLAUSKIENĖ et al.,(2006).

Ressalta-se que o conteúdo informativo de um marcador molecular permite diferenciar cada técnica quanto à sua maior ou menor adequação às análises. Outra característica importante na adequação das técnicas a diferentes análises é a acessibilidade ao usuário. Neste caso, leva-se em consideração fatores como custo, mão-de-obra e rapidez dos ensaios (CHAVES, 2007), e estes critérios são bem distintos entre os tipos de marcadores moleculares mais comumente utilizados.

2.3.1 Microssatélites

A descoberta do DNA satélite em 1960 através da centrifugação do material genético permitiu a identificação de diferentes bandas de DNA que foram classificadas de acordo com sua funcionalidade e peso de sedimentação. A banda principal contém os genes e as bandas secundárias apresentam seqüências de DNA repetidas e muito longas, que foram chamadas de bandas satélites.

Minissatélites são seqüências de DNA repetitivo de regiões do genoma com aproximadamente 15 ou mais pares de bases repetidas. JEFFREYS et al. (1985), desenvolveram a técnica DNA-fingerprinting (seqüências de nucleotídeos específicas de cada ser vivo) ao comprovar que o número de repetições dos minissatélites eram diferentes entre indivíduos de uma mesma espécie.

Os microssatélites são seqüências simples repetidas de nucleotídeos que apresentam ampla distribuição no genoma dos seres vivos. São denominadas por seqüências simples repetidas SSR (Sequence Simple Repeats - Seqüências Simples Repetidas) ou STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site- Seqüência Alvo em Região de Microssatélite) ou Microssatélites (SALLES et al., 2003). Estes nucleotídeos são repetidos, geralmente de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em “*tandem*”, visualizados na Figura 3, sendo amplamente distribuídas no genoma dos eucariotos, apresentam classificação de acordo com o número de nucleotídeos e a complexidade da seqüência que compõe as repetições e suas variações, em número de repetições, representam o grau de polimorfismo do marcador em um determinado *locus*. A genotipagem, determinação do número de repetições de um específico microssatélite, de vários *loci* de microssatélites representa um perfil característico de cada indivíduo, “*fingerprinting*” (MOORE et al., 1994; REGITANO e COUTINHO, 2001).

taxonômicos de maior hierarquia (intergenético), famílias por exemplo. Pois as regiões flaqueadoras onde os “*primers*”, ou iniciadores, se anelam podem não está conservadas ou ter sofrido algum tipo de mutação, limitando as interpretações dos dados obtidos.

Porém, há inúmeras contribuições, tais como: a caracterização genética e seleção de animais para preservação, conservação e participação nos programas de melhoramento genético, elaboração do primeiro mapa genético saturado de bovinos (BISHOP et al., 1994) com 290 *loci* de microssatélites, determinação de paternidade bovinos (USHA et al., 1995).

Estes marcadores foram utilizados amplamente em raças bovinas (WOMACK e MOLL 1986; LOFTUS et al., 1994; KEMP et al., 1995; MACHUGH et al., 1997; YANG et al., 1999; TROY et al., 2001; MANNEN et al., 2004; ZHANG et al., 2007) para diversos tipos de estudos genéticos.

2.3.2 Microssatélites Ancorados

Os microssatélites ancorados são marcadores dominantes que amplificam regiões de DNA localizada entre duas seqüências de microssatélites. O alto índice de polimorfismo intra-específico obtido por estes marcadores vem demonstrando seu potencial para análises de variabilidade genética em diferentes organismos (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Entre as classes de marcadores moleculares com base na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), os ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) definido por inter-repetições de seqüência simples são os marcadores moleculares conhecidos por microssatélites ancorados, os quais se caracterizam por sua natureza semi-arbitrária, amplificando através de PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar ou *primer*, apresentando uma correspondência específica com a região de nucleotídeos repetidas em tandem (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Os microssatélites ancorados são similares à técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) por apresentarem amplificação aleatória. Ambos possuem grande poder para discriminar as similaridades genéticas dentro e entre populações. No entanto, os microssatélites ancorados diferem quanto à expressão dos valores de similaridade genética e a detecção de polimorfismo que são superiores aos obtidos por marcadores RFLP e RAPD (ZIETKIEWICZ et al., 1994; GODWIN et al., 1998).

As vantagens dos microssatélites ancorados compreendem: (1) uma ampla distribuição no genoma dos eucarióticos (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994; SANCHEZ et al., 1996); (2) o produto de sua amplificação gera um padrão em multilocus viável que pode ser utilizado para análise de diversidade e construção de mapas genômico; (3) para o uso da técnica não existe necessidade de um conhecimento prévio sobre a seqüência a ser amplificada, como ocorre com a maioria dos marcadores (MORENO et al. 1998); e (4) segundo BORNET e BRACHARD (2001), estes marcadores permitem a produção de informações genéticas de modo rápido, fácil, com menores custos e alta reprodutibilidade.

Os ISSRs já foram utilizados para determinar a diversidade genética em *Zea mays* (KANTETKY et al., 1995), *Brassica carinata*, *Arabidopsis thaliana*, *Phaseolus vulgaris*,

Helianthus annuus, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* e *Homo sapiens* (BORNET e BRANCHARD, 2001), *Bombyx mori* (GOLDSMITH et al., 2005), *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica* (PAPLAUSKIENĖ et al., 2006). Estudos confirmam que estes marcadores permitem a obtenção de excelentes resultados para identificação de cultivares, divergência genética, avaliação de relações filogenéticas, mapeamento genômico, estudos populacionais e caracterização genética (GODWIN et al., 1998). Porém, na literatura ainda não foram identificados trabalhos desenvolvidos para análise genética e estrutura populacional de bovinos nativos utilizando esses marcadores moleculares.

3. REFERÊNCIAS

ABREU, C. de. **Caminhos antigos e povoamento do Brasil**. Rio de Janeiro: Briguiet. 1954. 121p.

AMARANTE, M. R. V.; WOMACK, J. E. Marcadores moleculares mapeados no cromossomo Y bovino, com emprego do painel de células somáticas híbridas irradiadas (WG-RH). **In: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**. Pirassununga, São Paulo, 2004.

ATHANASSOF, N. **Manual do criador de bovinos**. 6ed. São Paulo: Melhoramentos. p.818, 1957.

BARON, E. E. **Investigação de paternidade e seus efeitos no melhoramento de bovinos da raça gir leiteira**. 2000.63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz de Piracicaba, São Paulo, 2000.

BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W. et al. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v.136, p.619-639, 1994

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**. v. 19: p. 209-215, 2001.

BRITTO, C. M. C. **Características morfológicas e citoquímicas de sêmen de bovinos de rebanho de elite e gado Pé-duro**. 1987. 138 f. Dissertação (Mestrado em Genética) Universidade Federal de Campinas, Campinas, 1987.

BRITTO, C. M. C. **Polimorfismo do cromossomo Y no plantel de gado Pé-Duro da Embrapa/PI**. 1995. 86f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de

Campinas, Campinas, 1995

BRITTO, C. M. C. Citogenética do Gado Pé-duro. Teresina. **EDUFPI**, 80p. 1998.

CAMARGO, A. H. A. Ganado criollo del Brasil: Origen y características zootécnicas.

Boletim de Informacion sobre los Recursos Geneticos Animales. Roma, p. 11-16, 1990.

CARVALHO, J. H.; PEREIRA, P. R. Projeto para implantação de um núcleo de preservação de gado Pé-duro ou curraleiro. Teresina, EMBRAPA/UEPAE de Teresina. 17p. 1981.

CARVALHO, J. H. Gado Pé-duro: esperança de preservação. **BNB Notícias**, Fortaleza, n. 42, p. 4. 1983.

CARVALHO, J.H. Relatório de atividades do núcleo de preservação do gado Pé-duro ou curraleiro. EMBRAPA/Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual/UEPAE de Teresina. 17 p.1984.

CARVALHO, J. H. Pé-duro, patrimônio preservado no Piauí. *Dirigente Rural*, São Paulo, n. 42, p. 26-28. 1985.

CARVALHO, J. H.; AMORIM G. C. **Preservação e avaliação do gado Pé-Duro**. n. 44, 1989 p.1-5, Embrapa. Teresina (Comunicado técnico).

CARVALHO, J. H. Potencial econômico do bovino pé-duro. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 19p.

CEPEA. Mercados agropecuários: leite: Disponível em <<http://www.cepea.esalq.usp.br/leite/>> Acesso em 11 jan. de 2008.

CHAVES, R. A. Marcadores Moleculares. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL008.htm>>. Acesso em: 20 set. de 2007.

CUNNINGHAM, E. P. Quantitative approaches to animal improvement. In: **Proc. 4th World Congress Genetic Applied Livestock Production**. 1990.

DIETZ, A. B.; DETILLEUX, J. C.; FREEMAN, A. E. et al. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 400-405, 1997.

DOMINGUES, O.; SANFORD, P.; MELO, J.M.; MAIA, A.L.; COELHO, A. A. Preservação e seleção das raças nativas de gado do nordeste. Seção Fomento Agrícola no Ceará, n , p 1-28, 1956.

EGITO, A. A. **Uso de marcadores RAPD na identificação e caracterização genética de raças bovinas existentes no Brasil**. 1995. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.

EMBRAPA. Pesquisa incrementa inserção do pé-duro no sistema de produção. **Meio-Norte**: Jornal do Centro de Pesquisa Agropecuário do Meio-Norte, Teresina, 19 set., 2006, ano 6, n.19, p 4-5.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3^a ed. Brasília: Embrapa/CENARGEM, 1998.

GILLIESPIE, B. E.; JAYARAO, B. M.; DOWLEN, H. H. et al. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2049-2053, 1999.

GIOVAMBATTISTA, G.; RIPOLI, M. V.; PERAL-GARCIA, P. et al. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. **Animal Genetics**. v. 32, p. 240-247, 2001.

GODWIN, I. D.; SANGDUEN, N.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; PIPERIDIS, G.; HAIG, S. M. Molecular contributions to conservations. **Ecology**. v. 79, p. 413-425, 1998.

GOLDSMITH, M. R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Annual review of entomology**. v. 50, p. 71-100, 2005.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.: **Introdução à Genética**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2002. 739p

GUPTA, A.K., VARSHNEY, J.P., UPPAL, P.K. Comparative studies on biochemical Índices in different breeds of equines. **Indian Veterinary Journal**, v. 71, n. 1, p. 26-30, 1994.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservations. **Ecology**. v. 79, p. 413-425, 1998.
JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, n. 314, p. 67-73. 1985

KANTETKY, R. V, ZHANG X, BENNETZEN J. L. ZEHR B. Z. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Molecular Breeding**. n. 1, p. 365–372, 1995.

KEMP, E. J., HISHIDA, O., WAMBUGU, J. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 26, p. 299-306, 1995.

LIMA, M. L. P.; BONILHA NETO, L. M.; RAZOOK, A. G. O gado caracu. **Revista dos criadores**, São Paulo, v.59, p28-30, 1990.

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

MACHUGH, D. E., SHRIVER, M. D., LOFTUS, R. T. Microsatellite DNA Variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of Taurine and Zebu Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 46, p. 1071-1086, 1997.

MANNEN H., KOHNO M., NAGATA Y. et al. (2004) Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 32, p. 539-44.

MARIANTE, A. S. Conservação de recursos genéticos animais: uma questão de bom senso. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.175-182.

MARIANTE, A. da S.; CAVALCANTE, N. Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil. Brasília: **EMBRAPA-CENARGEN**, p.232, 2000

MARTÍN-BURRIEL, I.; GARCÍA-MURO, E.; ZARAGOZA, P.; Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. **Animal Genetics**. n.30, pag177-182, 1999.

MOORE, S. S.; BYRNE, K.; BERGER, K. T.; BARENDSE, W.; MCCARTHY, F.; WOMACK, J. E.; HETZEL, D. J. Characterization of 65 bovine microsatellites. **Mammalian Genome**. n. 5, v. 2, p. 84-90. 1994.

MORENO S, MARTIN J. P, ORTIZ J. M. Inter-simple sequence repeat PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. **Euphytica**. n. 101, p. 117-125, 1998.

MORITZ, C. Defining evolutionary significant units for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 373-376, 1994.

MOTA, A. F.; GABRIEL, J. E.; MARTINEZ, M. L. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). **European Journal Immunogen.**, v. 29, p. 223-227, 2002.

NASCIMENTO, F. S. **Fundamentos do agrário**. Fortaleza: Imprensa Universária-UFC, 2003. 258p. : il.

NOGUEIRA NETO, A. F. **Aspectos da pecuária piauiense**. Teresina, Sociedade de Medicina Veterinária do Piauí, 7p. (Folheto no. 267 - UEPAE/Teresina) 1980.

PAPLAUSKIENĖ, V.; ČEKŠTERYTĖ, V.; PAŠAKINSKIENĖ, I.; TAMAŠAUSKIENĖ, D.; RAČYS, J. The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. **Biologija**. n. 3, p. 16–20, 2006.

PAREJO, J.C.; PADILLA, J.A.; RABASCO, A.; SANSIFORIANO, M.E; TRANCÓN, M.M. Population structure in the endangered Blanca cacerene bovine breed demonstrated by RAPD analyses. *Genes & Genetic Systems*. v. 77, p. 51-58, 2002

PEREIRA, J.C.C. 1999. **Melhoramento Genético Aplicado a Produção Animal**. Editora FEP-MVZ. Belo Horizonte, MG. 493p.: il

PRIMO, A. T. El ganado bovino ibérico en las Americas: 500 años despues. **Archivos de Zootecnia**, EMBRAPA/CPACT: Pelotas, v.41, p.421-432, 1992.

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

RIBEIRO, J. A. Os bovinos ibéricos nas Américas. In: **Anais 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Rio de Janeiro , 1993.

ROSA, A. N.; SILVA, L. O. C.; PORTO, J. C. A. **Raças mochas: história e genética**. Campo Grande: EMBRAPA CNPG, 1992. 64p.

ROSA, A. J. M. **Caracterização da raça nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares**. Piracicaba, 1997. 125p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

SALLES, G.; BUSO, C.; CIAMPI, A. Y. ; MORETZSOHN, M. de C.; AMARAL, Z. P. de S.. Protocolo para o desenvolvimento de marcadores microssatélites. Comunicado técnico. Brasília, 2003 p 11.

SANCHEZ, J. A, CLABBY B, RAMOS D, BLANCO G, FLAVIN F, VAZQUEZ E, POWELL R. Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L. (Atlantic salmon). **Heredity**. n. 77, p. 423-432, 1996.

SANTIAGO, A. A. Os cruzamentos na pecuária bovina. São Paulo. Instituto de Zootecnia, p. 254-255, 1975.

SERRANO, G. M. S. **Uso de marcadores moleculares RAPD na caracterização genética das raças bovinas nativas brasileiras**. 2001. 87p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. Brasília.

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

TAMBASCO, D. D.; ALENCAR, M. M.; COUTINHO, L. L.; TAMBASCO, A. J.; TAMBASCO, M. D.; REGITANO, L. C. de A. Caracterização Molecular de Animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. **Revista Brasileira Zootecnia**, n. 29, v. 4, p. 1044-1049, 2000.

TAKESHIMA, S.; SAITOU, N.; MORITA, M. et al. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. **Gene**, v. 316, p111-118, 2003.

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

TROY C. S., MACHUGH D. E., BALLEY J. F. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* v. 410, p. 1088–91, 2001

USHA, P.A.; SIMPSON, S.P.; WILLIAMS, J.L. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. **Animal Genetics**. v 26, p. 155-161,1995.

VALENTIM, M.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M. Comparação de protocolos para extração do DNA de *Lernaea sp.* (Copepoda: Cyclopoida). **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 25, n. 2, p. 219-222, 2003.

ZHANG, G. X.; WANG, Z. G.; CHEN, W. S.; WU, C. X.; HAN, X.; CHANG, H.; ZAN, L. S.; LI, R. L.; WANG, J. H.; SONG, W. T.; XU, G. F.; YANG, H. J.; LUO, Y. F. Genetic diversity and population structure of indigenous yellow cattle breeds of China using 30 microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 38, p. 550–559, 2007.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

WOMACK, J. E.; MOLL, Y. D. Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man. **Journal Hereditary**, v. 77, p. 2-7, 1986.

YANG, L.; ZHAO S. H.; LI, K. . Determination of relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 30, p. 452-456, 1999.

4. CAPITULO I

Segue as normas para publicação na revista *Biotechnology* ISSN: 1682-296X

Avaliação de protocolos para extração de DNA a partir de bulbos pilosos de bovinos

Glícia Maria de Almeida^{1,*}, Fábio Mendonça Diniz², Raimundo Martins Filho¹, Geraldo Magela Cortes Carvalho², Paulo Sarmanho de Costa Lima², Adriana Mello de Araújo²,
Cíntia de Souza Clementino³

¹ Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

² EMBRAPA Meio-Norte, CP: 01, CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brasil.

³ Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências da Natureza (CCN), UFPI, Teresina, PI, Brasil.

Resumo

O isolamento do DNA é uma etapa importante na análise de estrutura e organização do genoma dos animais. Existem na literatura vários métodos de extração de DNA de mamíferos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de três protocolos para extração de DNA de bulbos pilosos de bovinos. Coletaram-se pêlos de 250 bovinos da raça Pé-duro que foram conduzidas ao laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte. Avaliaram-se os protocolos CTAB, Chelex[®]100 e Chelex[®]100 com Proteinase K quanto ao tempo, segurança e quantidade de DNA extraído. Conclui-se que o protocolo Chelex100 com proteinase, apesar de requerer mais tempo, foi o que extraiu mais DNA, sendo um protocolo bastante seguro.

Palavras-chave: Chelex, PCR, Proteinase-K, CTAB.

* Email: gliciaalmeida@yahoo.com.br, autor para correspondência.

Introdução

O desenvolvimento da Biologia Molecular nas últimas décadas tem sido notável. Entre tantas ferramentas que permitem a condução de estudos na área, assim como na Genética, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que foi desenvolvida por **SAIKI et al. (1985)** e **MULLIS et al. (1987)**, permitindo a reprodução exponencial de fragmentos da molécula de DNA.

A PCR permite a realização de testes altamente sensíveis, cujas aplicações vão desde o diagnóstico clínico até programas de melhoramento animal. Contudo, tais procedimentos dependem da habilidade de extrair DNA em quantidade suficiente e com qualidade adequada à técnica que se pretende utilizar (**COELHO, 2003**), uma vez que o DNA é a matéria-prima para que se possa produzir qualquer conhecimento em Genética (**SOLLERO et al., 2004**).

O isolamento do DNA é uma etapa importante na análise da estrutura e organização do genoma dos animais. Independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração das bandas em gel de eletroforese (**ROMANO e BRASILEIRO, 1999**).

Existem na literatura vários métodos de extração de DNA de mamíferos (**MORIN, 1996**). Porém, o método de extração de DNA mais tradicional utiliza sangue periférico permitindo a obtenção de DNA de alta qualidade, ou seja alto peso molecular, sendo bastante utilizado em trabalhos que propõem conservação de material *ex situ*, uma vez que permite o DNA ser armazenado por longo tempo, o que não ocorre quando se utiliza protocolos não-invasivos (**SAMBROOK et al. 1989**).

Os diferentes protocolos para a obtenção de DNA surgem pela necessidade de adequação aos objetivos do trabalho e devem considerar as características e a origem do tecido ao qual se propõe realizar extração. Por exemplo, têm-se os protocolos para extração de DNA de plantas e animais, que utilizam tecidos morfológicamente bem distintos. Entretanto, os protocolos devem priorizar a extração do DNA de boa qualidade, independente da origem e da classificação do tecido (WALDSCHMIDT et al., 1997).

A extração de DNA de sangue periférico é um método invasivo de extração que requer mais tempo, utiliza substâncias tóxicas e voláteis, como o fenol, exigindo muito cuidado ao manipulá-lo, além de ter custos altos com reagentes.

Em estudos cuja proposta é definir a diversidade genética populacional, o grau de parentesco ou estabelecer filogenias, a obtenção de DNA de modo rápido, com segurança e em quantidade suficiente para análise, torna-se uma estratégia mais interessante. Uma alternativa para obter DNA de mamíferos em menor tempo, com mais segurança e em quantidades suficiente para realizar uma PCR, seria extraí-lo de tecido epitelial glandular, ou seja, dos bulbos pilosos.

A extração de DNA a partir de bulbos pilosos possui as vantagens de não oferecer risco à sanidade do animal e apresentar método de coleta e estocagem simples, com baixo custo, uma vez que não exigem reagentes ou equipamentos para conservação das amostras (VALDERRAMA, 1999).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de três protocolos para extração de DNA a partir de bulbos pilosos de bovinos, considerando aspectos como tempo, segurança e quantidade e qualidade de DNA extraído.

Material e Métodos

Coleta de Material

Coletaram-se aproximadamente 50 pêlos da vassoura (porção final da cauda) de 250 bovinos da raça Pé-duro, provenientes da Fazenda Experimental Octávio Domingues no município de São João do Piauí, Piauí. As amostras de pêlos foram armazenadas em envelopes de papel e conduzidas ao Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte onde foram conservados em local seco á temperatura ambiente. Selecionou-se 10 pêlos contendo bulbo piloso e cada bulbo foi cortado á 5 mm da base do pêlo. Em seguida o material selecionado foi armazenado em tubos *ependorfs* de 500µl esterilizados.

Protocolos de extração de DNA

Os protocolos foram selecionados para avaliar os critérios de tempo de extração, segurança (utilização de substancias tóxicas) e quantidade do DNA extraído.

O protocolo I, utilizando Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), foi realizado segundo o método proposto por **BOYCE & ZWICK (1989)** com adaptações. O protocolo II utilizou o polímero Chelex[®]100 em uma solução a 10% (**WALSH et al. 1991**) e o protocolo III utilizou Chelex[®]100 com adição de proteinase K (**LACORTE et al. 2004**).

No protocolo I adicionaram-se aos tubos *ependorfs* com os bulbos 500 µL de CTAB (200 mL de solução de CTAB: 160 mL H₂O milli-Q; 16,36 g NaCl; 400 mL mercaptoetanol; 20 mL 1 M Tris-HCl, pH 8,0; 8 mL 0,5 M Na₂.EDTA, pH 8,0; 4 g CTAB) que foram vortexados por 1 min. A mistura foi posteriormente incubada em banho-maria a 65 °C durante 1 h; a suspensão foi homogeneizada com um vórtex em intervalos de 30 min.

Após esse período, o material foi centrifugado a $14000 \times g$ por 2 min e o sobrenadante transferido para microtubos contendo 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico.

A solução foi homogeneizada e, posteriormente, centrifugada a $14000 \times g$ por 1 min para precipitação das proteínas na interface entre o CTAB e o álcool isoamílico. O sobrenadante foi transferido para um terceiro tubo contendo 250 μL de isopropanol resfriado (-20°C), homogeneizado e mantido por 30 seg a 4°C . Posteriormente, o DNA foi precipitado por centrifugação a $14000 \times g$ por 3 min e o sedimento lavado com etanol 75%. Centrifugou-se o material por 2 min, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 100%, sendo que esta lavagem foi repetida. Por fim, o material foi secado à temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar por 20 min e ressuscitado em Tris-HCl-EDTA (TE), 8.0 pH (filtrado e estéril) e armazenado a -20°C .

A extração de DNA empregando o protocolo II seguiu-se com a adição de 100 μl da solução Chelex[®]100 a 10% aos bulbos pilosos selecionados e então o material foi direcionado à incubação, sob 95°C , em banho-maria durante 20 min. O conteúdo foi então centrifugado a $14000 \times g$ por 3 min e o sobrenadante transferido para tubo de 1,5 μl e armazenando à temperatura de -20°C .

Para o protocolo III, 200 μL da solução Chelex100 a 10% e 1 μL de proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados aos bulbos pilosos e todo o material foi incubado a 55°C em banho-maria por 12 h. As amostras foram então centrifugadas a $14000 \times g$ por 3 min e transferiu o sobrenadante e armazenou o extraído a -20°C .

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese

Para confirmar a integridade do DNA e eficiência dos métodos de extração, foi realizada a amplificação da região controle no genoma mitocondrial via PCR. A solução foi realizada volume final de 20µl, contendo as seguintes concentrações: tampão de PCR 1,25× [20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% glicerol], MgCl₂ 1,75 mM, dNTP 800 mM, 0,5 pMol de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase e 2 µL da amostra de DNA (máximo de 100 ng). Na tabela 1 estão as informações sobre os primers utilizados para amplificação do DNA extraído a partir dos três protocolos. Após a reação, os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose com concentração de 2%.

TABELA 1. Características dos primers que amplificam na região controle do DNA mitocondrial utilizados para testar a eficiência dos protocolos de extração de DNA bovino a partir de bulbos pilosos.

| Primers | Sequência | Fragmentos (pb) | Ta °C | Referências |
|---------|---------------------------------|-----------------|-------|------------------------|
| AN3 | R-CGA GAT GTC TTA TTT AAG AGG | 375 | 45 | ANDERSON et al. (1982) |
| AN4 | F-GGT AAT GTA CAT AAC ATT AAT G | | | |
| 16Sar | R-CGCCTGTTTATCAAAAACAT | 376 | 50 | KESSING et al.(1989) |
| 16Sbr | F-CCGGTTTGAACCTCAGATACT | | | |

Avaliação do tempo de extração

A mensuração do tempo para extração de DNA em cada protocolo fez-se com uso de cronômetro. Não se somou ao tempo de execução de cada protocolo, o tempo gasto para selecionar os pêlos com bulbos.

Avaliação da Segurança dos Protocolos

Os protocolos foram estudados antes de iniciar a extração e estabeleceu algumas características que nortearam o aspecto de segurança nos procedimentos, tais como uso de compostos voláteis tóxicos (C1), uso de altas temperaturas (C2), uso de compostos mutagênicos (C3) e uso de objeto cortante (C4).

Avaliação da Quantidade de DNA

Utilizando gel de agarose a 2%, foi realizada a quantificação de DNA assim como recomendada por VALENTIM et al. (2003). A quantificação do DNA pode ser realizada por meio da comparação entre a intensidade das bandas visualizadas no gel de agarose das amostras extraídas com aquela observada em padrões de DNA lambda (MAREGONI, 2006), nas quais as concentrações de 5, 10 e 20 ng/ml foram selecionadas.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos quanto à avaliação do tempo permitem afirmar que o protocolo III requereu maior tempo para execução, 13 h. Enquanto o protocolo II foi realizado em menos tempo, 1 h. Quanto aos critérios de segurança (Tabela 2), confirmou-se que o protocolo I é o que exige maior cuidado, uma vez que utiliza compostos tóxicos, mesmo em pequenas quantidades, como clorofórmio que possui alta volatilidade e mercaptanol que tem alto poder mutagênico.

A quantidade de clorofórmio utilizada no protocolo I foi pequena, mas é necessário cuidado ao utilizá-lo, pois as respostas tóxicas ao clorofórmio dependam da via de entrada e principalmente da quantidade absorvida pelo organismo, os efeitos tóxicos mais notáveis ocorrem no sistema nervoso central e autônomo, imediatamente após a exposição e os

efeitos no fígado e nos rins aparecem posteriormente. Os sintomas de intoxicação severa apresentam um padrão semelhante aos ocorridos após anestesia (AZEVEDO et al., 2004).

Embora não existam na literatura trabalhos que reportem sob a biossegurança laboratorial ao se manusear mercaptanol, sabe-se que as características químicas conferem a esse composto poder de desestruturar a molécula de DNA, provocando mutações e conseqüentemente anomalias mitóticas. É um composto bastante volátil e ao contrário do clorofórmio, quantidades mínimas são potencialmente nocivas à saúde humana.

O rendimento de DNA extraído pelo protocolo III foi maior, contrapondo-se aos resultados encontrados por LACORTE et al. (2004), que utilizou pêlos e saliva de cavalos para extrair DNA, obtendo melhores resultados a partir do protocolo com Chelex sem proteinase K. O DNA obtido pelo protocolo III possui alto peso molecular (acima de 12.216 pb) e não se apresentou fragmentado nos géis de agarose a 0,8% (Figura 1). O protocolo I rendeu menor quantidade de DNA, porém foi o mais rápido e de procedimento mais simples. LACORTE et al. (2004) recomendam, no entanto, atenção com as concentrações de Chelex[®]100 para extração de DNA a partir de pêlos, pois a resina de Chelex pode comprometer a PCR, impedindo a amplificação do DNA.

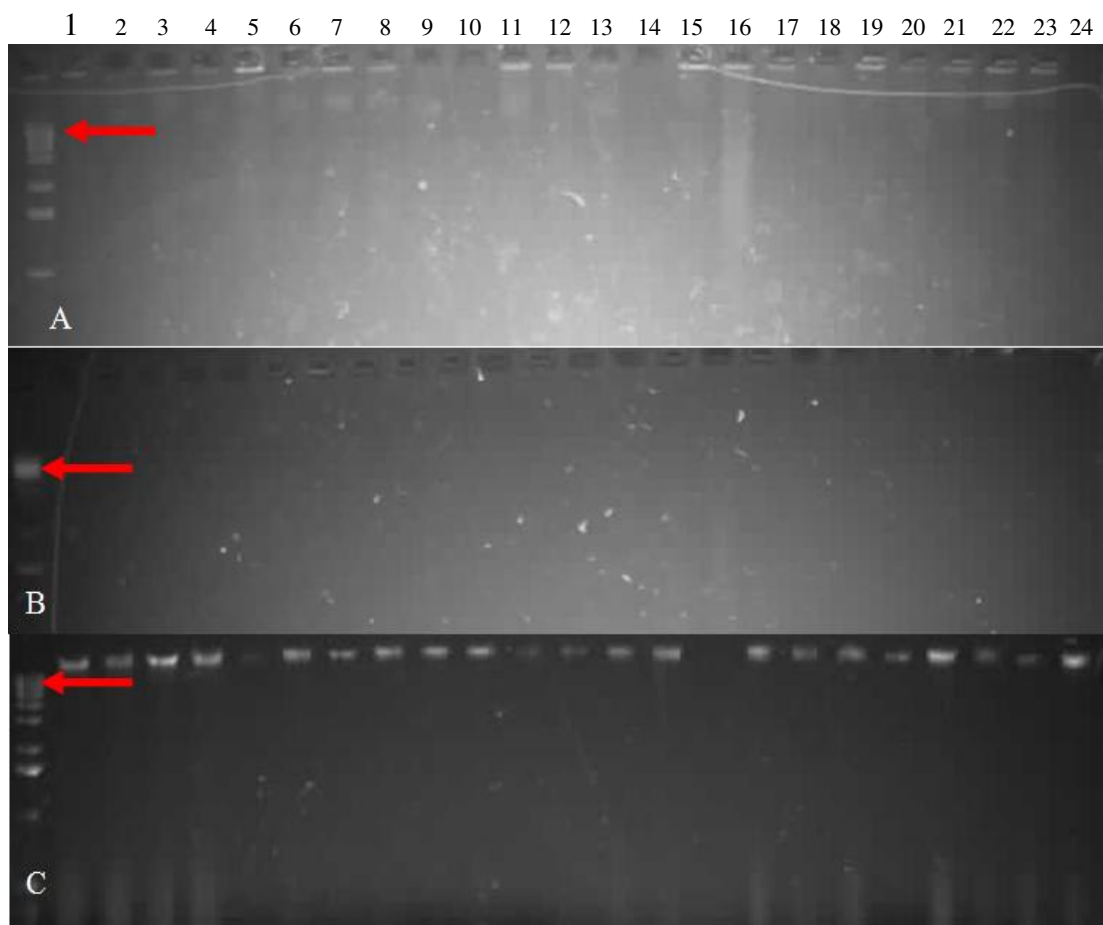


FIGURA 1. Géis de Agarose a 0,8% para visualizar DNA extraído de bulbos pilosos de bovinos nativos da raça Pé-Duro. As setas indicam o peso molecular marcador 1 kb para quantificação em cada protocolo.

Houve diferença significativa entres os protocolos para extração de DNA, quando observados os géis de extração. Apesar disso, não houve diferença qualitativa nem quantitativa entre os produtos da amplificação do DNA dos diferentes protocolos utilizando o primers universais AN3/AN4 e 16Sar/16Sbr do DNA mitocondrial (Tabela 3). Estes resultados são similares aos obtidos por **COELHO et al. (2004)** que ao avaliarem métodos de estocagem de DNA extraído de diferentes tecidos bovinos por protocolos distintos, obtiveram produtos da amplificação do primer RM29 com alta qualidade para todos os protocolos. Isso porque a PCR garante que pequenas quantidades de DNA sejam amplificadas, mesmo que não sejam visualizados DNA em gel de agarose, tal como verifica-se no protocolo I (**Figura 1**).

TABELA 3. Comparação da eficiência entre protocolos de extração de DNA de bulbos pilosos de bovinos da raça Pé-Duro. Tempo de extração em minutos, quantidade de DNA visualizado em Gel de agarose e médias dos fragmentos obtidos por PCR.

| | Protocolos | | |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | I | II | III |
| Tempo (min) | 218 ^b | 90 ^c | 6198 ^a |
| Quant. DNA | 21 ^b | 0 ^c | 44 ^a |
| 16Sar/16Sbr | 41.4 ^b | 44.2 ^a | 45 ^a |
| AN3/AN4 | 45.8 ^a | 45.2 ^a | 48.8 ^a |

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

A quantidade, pureza e integridade do DNA segundo **MESQUITA et al. (2001)**, dependem de muitos fatores e têm uma grande influência no resultado da PCR. Por essa razão, os produtos da amplificação de AN3/AN4 e 16Sar/16Sbr diferiram percentualmente entre os protocolos. Porém, as amplificações foram melhores com DNA obtido pelo Protocolo III. Acredita-se que isso ocorra em função da proteinase K que atua sobre o material *overnight*. **MESQUITA et al. (2001)** ao comparar os protocolos com e sem proteinase K, para a extração de DNA a partir de diferentes tecidos de mamíferos, incluindo pêlos, obteve resultados sobre a qualidade de DNA similares aos encontrados nesse estudo.

Os pares de primers AN3/AN4 e 16Sar/16Sbr produziram bandas com excelente perfil para todos os protocolos (**Figura 2**) embora, estes primers ainda não tenham sido utilizados na raça Pé-Duro. Possivelmente, no Protocolo I, substâncias tenham inibido a PCR, ou as regiões do DNA genômico que amplificam para esses primers tenham sido danificadas em algumas amostras.

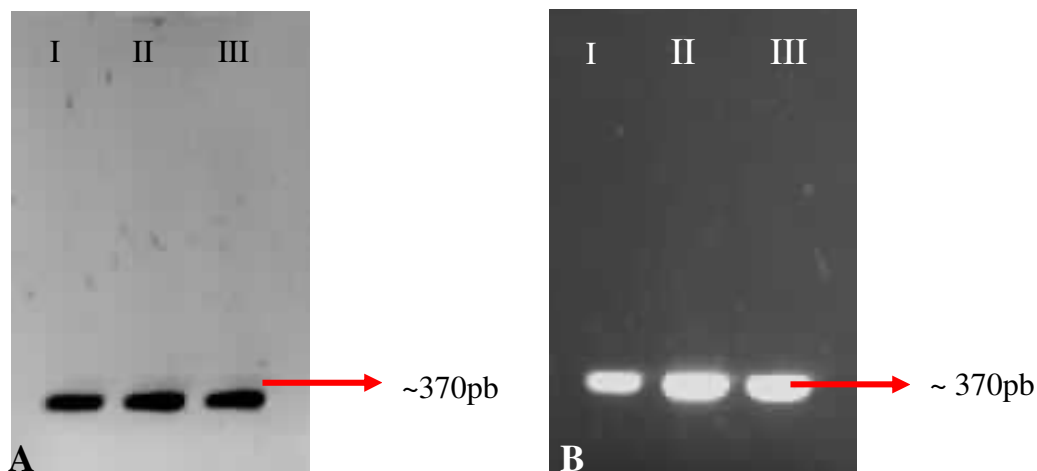


Figura 2. Produtos da PCR utilizando os primer 16Sar/16Sbr (A) e AN3/AN4 (B), confirmando a eficiência dos três protocolos de extração de DNA a partir de bulbos pilosos de bovinos Pé-duro quanto a amplificação de DNA mitocondrial em bovinos nativos.

Conclusão

Os protocolos que utilizam a resina de Chelex com ou sem Proteinase K são eficiente para extração de DNA a partir de bulbos pilosos de bovinos da raça Pé-Duro. Embora exija mais tempo para realização, fornece grande quantidade de DNA de alto peso molecular, é um protocolo simples e não oferece riscos ao manipulador da técnica, podendo ser aplicado com facilidade para realização de estudos genéticos em bovinos da raça.

Referencias Bibliográficas

- ANDERSON, S.; DE BRUIJN, M. H.; COULSON, A. R.; EPERON, I. C.; SANGER, F.; YOUNG, I. G. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. **J. Molec. Biol.** v.156, p.683-717.1982.
- AZEVEDO, C.; LIMA, D.; REMIÃO, F. Clorofórmio. Porto: Faculdade de Farmacologia, 2004. Disponível em: <<http://www.ff.up.pt/toxiologia/monografias/ano0405/clorofórmio/cloro/clorof.htm>> Acesso em: 02 dez. 2007.
- BOYCE, T. M.; ZWICK, M. E. Mitochondrial DNA in bark weevils: size, structure, and heteroplasmy. **Genetics Austin**, v.12, n.3, p.825-836, 1989.
- COELHO, E. G. A.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEIXEIRA, C. S.; SAMPAIO, I. B. M.; RODRIGUES, S. G.; ALVES, C. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v.56, n.1, p.111-115, 2004.
- KESSING, B.; CROOM, H.; MARTIN, A.; MCINTOSH, C.; OWEN MCMILLAN, W; PALUMBI S... The simple fools guide to PCR. **University of Hawaii**, Honolulu, 1989.
- LACORTE, G.A.; DIAS, I. M.G.; CARVALHO, M.R.S. Extração não-invasiva de DNA de *Equus caballus*: uma avaliação de métodos. In: **V Simpósio da Sociedade Brasil de Melhoramento Animal**. Pirassununga, 2004.
- MAREGONI, N.G.; MACHADO, M.R.F.; GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos . **Ciência Agrária**, Londrina, v.27, n1, p99-106,2006
- MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n.4, p. 314-319, 2001.
- MORIN, P.A. ; WOODRUFF, D.S. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. In **Molecular Approaches in Conservation Biology**, Oxford University Press, p 298-313, 1996.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol.**, v. 155, p. 335, 1987.

- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.2, n.9, p.40-43, 1999.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F.; MANIATIS T. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 13., 2004. Brasília. *Anais...* Brasília: SBZ, 2004. CD-ROM. UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. *SAEG* : sistema
- VALDERRAMA, X.; KARESH, W.B.; WILDMAN, D.E.; MELNICK, D.J. Noninvasive methods for collecting fresh hair tissue, **Mol. Ecol. Technical Notes**, v.8, p1749-1752,1999.
- VALENTIM, M.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M. Comparação de protocolos para extração do DNA de *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida). **Acta Scientiarum**. Maringá, v.25, n.2, p.219-222, 2003.
- WALDSCHMIDT, A. M.; SALOMÃO, T. M. F.; BARROS,E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.421-423, 1997.

5. Capítulo II

Segue normas para publicação na *Genetics and Molecular Biology* ISSN 1415-4757

Diversidade genética e estruturação populacional da raça Pé-Duro

Glícia Maria de Almeida^{1,*}, Fábio Barros Britto², Raimundo Martins Filho¹, Geraldo Magela Cortes Carvalho², Paulo Sarmanho de Costa Lima², Geice Ribeiro da Silva³, Fábio Mendonça Diniz²

¹ Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

² EMBRAPA Meio-Norte, CP: 01, CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brasil.

³ Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências da Natureza (CCN), UFPI, Teresina, PI, Brasil.

Resumo

A análise da estrutura genética de uma população é um passo importante para potencializar a produção animal. Utilizando as técnicas e as ferramentas da Biologia Molecular, pode-se definir a estrutura de uma população e sua variabilidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade gênica de populações de bovinos nativos do Piauí, a raça Pé-Duro através de marcadores microssatélites ancorados. As amostras de DNA foram extraídas a partir dos bulbos pilosos da vassoura dos animais com protocolo Chelex100 com proteinase K, nos Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte. Utilizou-se os programas estatísticos ALERQUIN e HICKORY para análise da estrutura genética da população. Dos 28 primers de microssatélites ancorados, 5 amplificaram bandas consistentes e reprodutíveis aos mesmos loci em 84 animais produzindo 55 *loci* polimórficos. Os fragmentos amplificados correspondem a bandas com tamanhos variáveis entre 1900 (UBC-895) e 300 (UBC-886). O valor de Φ_{ST} , Φ_{SC} e Φ_{CT} foi 20,24%, 21,59% e 58.17%, respectivamente. As populações de bovinos apresentam variabilidade genética e forte estrutura populacional, sugerindo a realização de manejo sustentável que contribuía com manutenção da variabilidade e conservação desse recurso genético de grande valor para pecuária brasileira.

Palavras-chave: raça nativa, microssatélites ancorados, estrutura populacional, PCR.

Introdução

A diversidade genética dos animais domésticos é expressa pelas diferenças existentes dentro e entre populações (Pereira, 1999; Griffiths, et al., 2002; Magalhães, et al., 2007). Na pecuária, a manutenção da variabilidade é extremamente importante garantindo de modo sustentável o progresso e o desenvolvimento dos rebanhos mantendo a baixa consangüinidade. A constituição genética das raças nativas de bovino na América do Sul formou-se a partir de rebanhos europeus que pertenciam aos táxons *Bos taurus ibéricos*, *Bos taurus aquitanicus* e *Bos taurus batavicus*, introduzidos no período da colonização (Athanasoff, 1957) durante o século XVI.

No Brasil as raças nativas se formaram a partir de diferentes rebanhos introduzidos pelos portugueses. Por vários séculos, os animais foram expostos a condições ambientais adversas que conduziram a seleção natural e a constituição de novo conjunto gênico. Pois, somente os genótipos que expressaram resistência para sobrevivência nas condições do semi-árido, com temperaturas elevadas, escassez de alimento, deficiência nutricional e infestações de diversos parasitas, tiveram sucesso reprodutivo tornando-se um recurso genético de grande valor ecológico, histórico e econômico.

As raças nativas entraram em extinção com a introdução de raças exóticas na pecuária brasileira. Os cruzamentos entre raças nativas e as raças comerciais geraram descendentes com características produtivas superiores, mas essas características não permaneceram nas gerações seguintes refletindo o efeito da heterose, e seus descendentes tornaram-se mestiços, sem raça definida (Pereira, 1999).

A caracterização genética é uma etapa importante aos programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos. O conhecimento sobre a variabilidade, grau de

endogamia e a distância genética entre as populações pode auxiliar na escolha dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*. Além disso, possibilita a indicação de acasalamentos ou cruzamentos que favorecerão a manutenção da máxima variabilidade genética, potencializando os esforços na manutenção de amostras que apresentem real valor genético (Egito et al., 2001).

Os parâmetros genéticos populacionais estimados com base em marcadores podem ser utilizados para diversos fins. Quando o objetivo é a conservação de espécies importantes, ou de espécies que estão inseridas em biomas que devem ser preservados, estes parâmetros podem ser úteis na detecção de populações que apresentem diferentes magnitudes de variabilidade genética e que, portanto, requerem diferentes estratégias para sua conservação *in situ* ou *ex situ* (Avisé & Hamrick 1996, Newton *et al.* 1999 Spritze, et al., 2003). O interesse é domesticação e utilização econômica da espécie, estes parâmetros podem auxiliar na definição de programas de coleta visando a seleção de apenas parte da variabilidade que seja de interesse para o melhorista (Borém 1998).

As informações produzidas pelos marcadores moleculares podem ser utilizadas para compreensão dos alelos nas populações, permitindo uma compreensão consistente dos processos microevolutivos responsáveis pela diferenciação das populações, até que se tornem espécies (Reis, 1996; Avisé, 2000). Estas informações, aliadas aos conhecimentos da história de vida e de características ecológicas da espécie, permitem conhecer parte da sua biologia, bem como da sua interação com outras espécies do bioma no qual ela está inserida. As espécies devem ser preservadas. E as populações em processo de especiação a exemplo das raças nativas do semi-árido não são exceção, pois, além de apresentarem adaptação ao Bioma específico da Caatinga, são recursos genéticos naturais que compõe a biodiversidade brasileira.

A análise da estrutura genética de uma população depende das técnicas e ferramentas da Biologia Molecular entre as quais se destacam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e os Marcadores Moleculares. Os mais informativos para determinação de parentesco e estudos intergenético são os microssatélites, embora apresentem exigências que podem ser contornadas com uma nova classe de marcadores, os microssatélites ancorados.

Os microssatélites ancorados estão entre duas regiões de microssatélites que apresentam pequenas repetições em *tandem* e está localizado na região de DNA satélite, que é um tipo de DNA com propriedade física diferente do DNA funcional, pois é abundante em nucleotídeo de adenina e timina (Kavalco et al., 2007).

O objetivo desse trabalho foi analisar a diversidade genética e estrutura populacional da raça Pé-Duro utilizando marcadores microssatélites ancorados.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em quatro fazendas situadas no Estado Piauí. Sendo 84 amostras da fazenda Faveira localizada no município de Elesbão Veloso (06° 12'07" LS, 42°08'25" WL), 94 amostras da fazenda Tocaia localizada no município de Campo Maior (04°49'40" SL, 42°10'07" WL), 82 amostras da fazenda Convencido situada no município de Barras (04°14'49" SL, 42°17'45" WL) e 104 amostras na fazenda Octavio Domingos localizada no município de São João do Piauí (08°21'29" SL, 42°14'48" WL). As fazendas pertencem a Associação Brasileira de Criadores de Pé-Duro (ABPD), exceto a fazenda Octavio Domingues.

A coleta das amostras foi realizada a partir da extração de aproximadamente 50 pêlos com bulbos pilosos da vassoura dos animais. Os pêlos foram armazenados em envelopes de papel e conduzidas ao Laboratório de Biologia Molecular & Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte, permanecendo conservados em local seco á temperatura ambiente até a extração de DNA.

Extração de DNA de bulbos pilosos

Selecionou-se 10 pêlos contendo bulbo piloso e cada bulbo foi cortado á 5 mm da base do pêlo que foi armazenado em tubos (*ependorf*) de 500µl esterilizados. O DNA foi extraído utilizando o protocolo adaptado de LACORTE et al. (2004). Aos bulbos foram adicionados em 200 µL da solução Chelex®100 a 10% e 10 µL de proteinase K (20

mg/mL) que foram vortexados e incubado a 55 °C em banho-maria por 12 h. As amostras foram centrifugadas a 14000 × rpm/3 min. O sobrenadante foi transferido para outro *ependorfs* armazenando o material extraído a -20 °C. A quantificação de DNA foi realizada através de espectrofotometria com absorbância (280/260) como recomendado por Valentim et al. (2003).

Seleção de marcadores moleculares

Os primers de microssatélites ancorados utilizados nesse estudo foram selecionados de acordo com parâmetros verificados na literatura disponível. Na Tabela1 pode-se visualizá-los com suas respectivas seqüências e temperaturas de anelamento.

Tabela1. Microssatélites ancorados para caracterização genética da raça Pé-Duro

| Marcador | Seqüência | Ta (°C) |
|-----------------|------------------------|--------------------|
| 802 | ATA TAT ATA TAT ATA TG | 28 |
| 803 | ATA TAT ATA TAT ATA TC | 28 |
| 804 | TAT ATA TAT ATA TAT AA | 25 |
| 805 | TAT ATA TAT ATA TAT AC | 28 |
| 816 | CAC ACA CAC ACA CAC TA | 45 |
| 819 | GTG TGT GTG TGT GTG TA | 45 |
| 821 | GTG TGT GTG TGT GTG TT | 45 |
| 822 | TCT CTC TCT CTC TCT CA | 45 |

| | | |
|---------|-------------------------------|------|
| 823 | TCT CTC TCT CTC TCT CC | 47 |
| 827 | ACA CAC ACA CAC ACA CG | 47 |
| 828 | TGT GTG TGT GTG TGT GA | 45 |
| 829 | TGT GTG TGT GTG TGT GC | 47 |
| 834 | AGA GAG AGA GAG AGA GYT | 48 |
| 840 | GAG AGA GAG AGA GAG AYT | 48 |
| 841 | GAG AGA GAG AGA GAG AYC | 50 |
| 845 | CTC TCT CTC TCT CTC TRG | 48 |
| 856 | ACA CAC ACA CAC ACA CYA | 48 |
| 857 | ACA CAC ACA CAC ACA CYG | 50 |
| 862 | AGC AGC AGC AGC AGC AGC | 55 |
| 865 | CCG CCG CCG CCG CCG CCG | 69 |
| 873 | GAC AGA CAG ACA GAC A | 47,4 |
| 876 | GAT AGA TAG ACA GAC A | 38 |
| 881 | GGG TGG GGT GGG GTG | 53 |
| 886 | VDV CTC TCT CTC TCT CT | 37 |
| 888 | BDB CAC ACA CAC ACA CA | 37 |
| 895 | AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC | 50 |
| 899 | CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A | 53 |
| 900 | ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA | 62 |
| EMBRI01 | GAC AGA CAG ACA GACA GT | 50,9 |

Perfil da PCR para microssatélite ancorado

O perfil geral apresentou as seguintes concentrações 1,25x [20 mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1mM DTT; 50% glicerol], MgCl₂ 1,75mM, dNTP 800 µM, 0,5 pMol de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase e 2µL da amostra de DNA (aproximadamente 20ng). A reação foi realizada com volume final de 10µl. O programa da PCR consistiu de temperatura inicial para desnaturação de 94°C por 90seg, extensão á 94°C por 50seg, anelamento variável entre 28°C e 37°C por 50seg com 40 ciclos e extensão final a 72°C por 5min.

Tabela 2. Perfil dos reagentes usados para PCR com microssatélites ancorados.

| Amostras | REAGENTES | | | | | | | |
|----------|-----------|---------------------------|--------------|----------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | Tampão | MgCl ₂ (mM) | dNTP (µL) | Primer (µM) | Taq (U) | DNA (ng) | Coadjuvante | Loci UBC |
| Pé-Duro | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | 822 840 |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | 841 845 |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | 862 873 |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | 886 899 |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | 900 |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | 895 |
| | 1× buffer | 1,35 | 1,6 | 1,0 | 0,2 | 20 | – | |
| | 1× buffer | 1,35 | 0,8 | 1,0 | 0,2 | 20 | Q Solution | |

Eletroforese

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese utilizando gel de agarose 2% em tampão de corrida contendo Tris, ácido bórico e EDTA (TBE 1X), em voltagem constante de 100 V até alcançar a distância de aproximadamente de 10 cm do poço de carregamento. Utilizou-se como marcador de massa molecular o *Ladder* de 1 Kb (Gibco-BRL). A coloração do gel foi feita com brometo de etídio (0,6 µL/mL), sendo em seguida

fotografado sob luz ultravioleta usando o sistema de fotodocumentação GeneWizard (Syngene).

Análise Estatística

A partir da presença (1) ou ausência (0) de fragmento amplificado para cada indivíduo amostrado foram construídas matrizes binárias no programa Microsoft® Office Excel (Microsoft Corporation). Essa informação foi analisada pelos programas ARLEQUIN v2.0 (Schneider et al., 2000) e HICKORY v1.0.4 (Holsinger et al., 2002) para avaliação da diversidade genética da raça Pé-Duro e no final foram comparados os resultados gerados pelos diferentes programas.

As análises estatísticas como o coeficiente de similaridade de Jaccard (S_j) foram realizadas com o programa PAST v1.34 (Hammer et al., 2001) e o dendrograma foi construído com base no método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*). Para estabelecer do número mínimo de marcadores ISSR capazes de fornecer informações estatisticamente confiáveis em estudos de diversidade genética da raça foram feitas amostragens com reposição de números crescentes de locos ISSR (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54 e 55) a partir das matrizes binárias. Para cada conjunto de dados, os valores de Φ_{ST} , Φ_{SC} , Φ_{CT} foram calculados com o programa ARLEQUIN.

Resultados e Discussão

Entre os 29 *primers* de microssatélites ancorados que foram testados selecionou-se 10 para otimização (UBC-822, UBC-840, UBC-841, UBC-845, UBC-862, UBC-873, UBC-886, UBC-899, UBC-900, UBC-895). Destes, apenas 5 amplificaram bandas

consistentes e reprodutíveis (UBC-862, UBC-873, UBC-886, UBC-895, UBC-900) para todos *loci* em 84 animais de um total de 364 animais provenientes de diversas fazendas do Estado do Piauí.

Os fragmentos amplificados corresponderam as bandas com tamanhos variáveis entre 300 pb (UBC-886) e 1900 pb (UBC-895) como se pode verifica na Tabela 3. Estudos sugerem que os fragmentos para apresentarem uma boa reprodutibilidade da reação de amplificação de locos de ISSR devem ter extensão entre 200 e 1.500pb (Fowler et al., 1998).

O número de bandas amplificadas por marcador variou de 7 (UBC-886) a 21 (UBC-895) obtendo-se ao final das amplificações um total de 55 locos polimórficos que apresentaram ótimo padrão e reprodutibilidade (Figura 1) que permitem confirmar o potencial dos *primers* de microssatélites ancorados para estudos de caracterização genética de animais.

Tabela 3. Caracterização dos primers de ISSRs, selecionados para as análises da variabilidade genética dos bovinos da raça Pé-Duro no Piauí.

| <i>Primer</i> | Seqüência (5'→3') | Número de bandas polimórficas | Amplitude dos tamanhos dos fragmentos |
|---------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| UBC862 | AGCAGCAGCAGCAGCAGC | 7 | 500 – 1050 |
| UBC873 | GACAGACAGACAGACA | 8 | 500 – 1250 |
| UBC886 | VDVCTCTCTCTCTCTCT* | 9 | 300 – 1635 |
| UBC895 | AGAGTTGGTAGCTCTTGATC | 21 | 350 – 1900 |
| UBC900 | ACTTCCCCACAGGTAAACACA | 10 | 450 – 1800 |
| Total | – | 55 | 300 – 1900 |

* Nomenclatura IUB para bases degeneradas “V” = A+C+G e “D” = A+T+G.

Os marcadores moleculares microssatélite ancorados além de possuírem menores custos, tempo e trabalho laboratorial reduzido os resultados, são viáveis para compreensão da estrutura populacional de populações ainda não estudadas, pois fornecem conhecimento genômico. Assim, como se verificou no estudo da estrutura populacional dos bovinos nativos da raça Pé-Duro, nativa da Região Nordeste.

Os primers ISSRs ancoram em regiões de microssatélites que apresenta pequenas repetições em *tandem*. Essas seqüências estão localizadas em região de DNA satélite, uma classe de material genético mais denso que o material genético informativo (Kavalco, et al. 2007).

Comparando-se o potencial informativo dos ISSRs aos marcadores RAPD verifica-se que os microssatélites ancorados são ferramentas mais eficientes em relação aos marcadores dominantes arbitrários (RAPD) ou semi-arbitrários para realizar análise genética em populações ainda não estudadas.

Spritz et al. (2003), por exemplo utilizou 43 marcadores RAPD para obter 77 loci na raça Criola Lageana. E autores citados Spritz et al. (2003) utilizaram número de *primers* superior aos que foram descritos nesse trabalho obtendo valores de variabilidade genética bem próxima ao encontrado por ela para bovinos nativos.

O aspecto mais interessante sobre os ISSR é a quantidade de bandas polimórficas produzidas e não necessariamente o número de *primers* utilizados na análise. Gilbert et al. (1999) testaram 10 *primer* ISSR em genoma de *Canis lupus* e apenas dois foram suficientes para delinear a estrutura genética da população desse mamíferos. Similarmente, Prevost e Wilkinson (1999) utilizaram 4 *primers* de ISSR para distinguir 34 cultivares de batata, confirmado o alto polimorfismo e a eficiência desses marcadores para avaliação de genomas ainda não estudados.

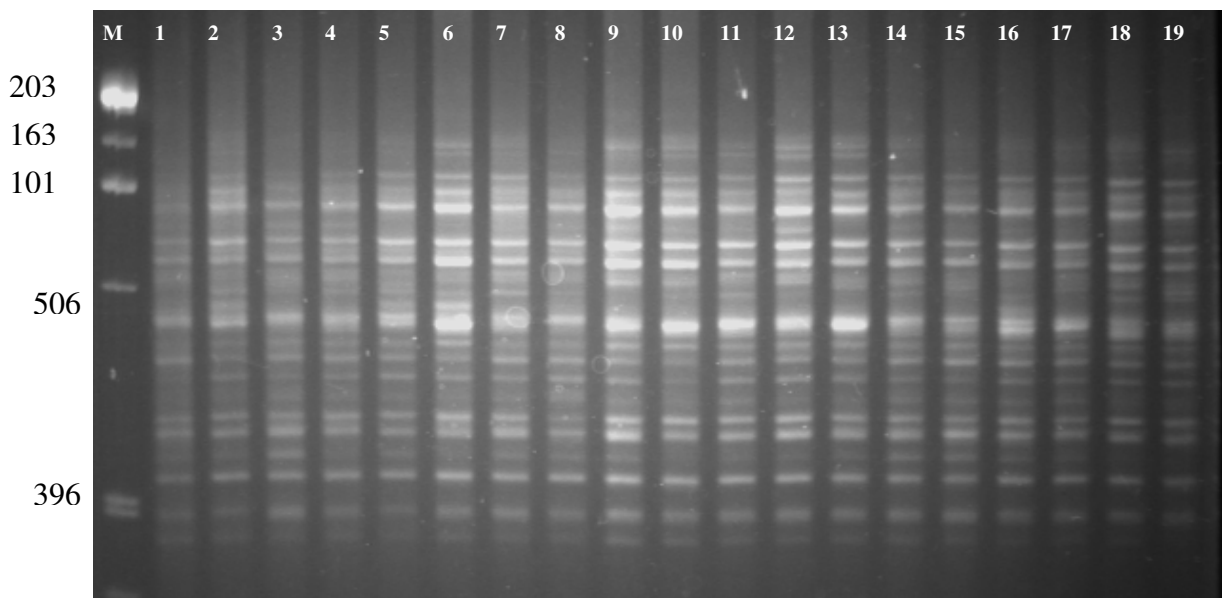


Figura 1. Gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio para análise eletroforética de produtos de amplificação obtida com primer UBC895. Os perfis: M= Ladder 1Kb; 1-19= animais da raça Pé-Duro. O tamanho dos fragmentos está indicado ao lado da figura e corresponde ao número de pares de bases (pb).

A partir dos dados gerados por esses marcadores foi possível determinar a variabilidade genética da raça Pé-Duro gerada pelo programa estatístico ARLEQUIN (Ver Tabela 4). Analisamos quatro populações distribuídas ao Norte, Centro e Sul do Estado do Piauí. Essas populações possuem histórias diferentes apesar de compartilharem o mesmo objetivo de existência, a conservação. Elas se formaram pela composição de animais que sobreviveram dos rebanhos primordiais e se misturaram com raças bovinas indianas ou permaneceram isoladas dos rebanhos comerciais, sem qualquer interferência de manejo.

Os programas estatísticos utilizados para determinação do índice de fixação genética são métodos que fornecem uma variável análoga ao F_{st} , usados quando dados são produzidos por marcadores co-dominantes, com diferentes bases de cálculos e informa sobre a fixação dos genes na população. Os valores de variabilidade genética para Φ_{ST} , Φ_{SC}

e Φ_{CT} alcançaram o platô a partir de 42 *loci* o que indica consistência dos resultados obtidos uma vez que foram avaliados 55 *loci*. E o desvio dessa variação foi inferior a 0,02 como pode ser observada na figura 2.

Esses resultados podem ser compreendidos pela estruturação genética dos genótipos amostrados (Tabela 4). E sua confiabilidade pode ser confirmada quando comparamos com os valores de Φ_{ST} (ARLEQUIN) e Θ^B (HICKORY) que foram respectivamente 0,40 e 0,41.

Os dados gerados pela AMOVA evidenciaram que os conjuntos dos genótipos fornecidos pela Fazenda Convencido e Tocaia (Grupo I), Faveira (Grupo II) e Octávio Domingos (Grupo III) sugerem a estrutura genética mais forte acordando com os resultados obtidos nas árvores de Neighbour-joining e Cluster Analysis visualizados na figura 3.

Tabela 4. Análise da Variabilidade Molecular da raça nativa de bovinos Pés-Duros.

| Fonte de Variação | GL | SQ | Componentes de variância | Percentual de Variação |
|-----------------------------------|----|---------|--------------------------|------------------------|
| Entre Grupos | 2 | 207.411 | 2.43454 | 20.24 |
| Entre populações dentro de grupos | 1 | 73.105 | 2.59714 | 21.59 |
| Entre população | 80 | 559.686 | 6.99607 | 58.17 |
| Total | 83 | 840.202 | 12.02776 | |

Significância (*P*) ao percentual de 0,001.

Os valores de Φ_{ST} e Φ_{SC} para a raça Pé-Duro são significantes ($p < 0,0001$) para os agrupamentos estabelecido com base na análise do genótipos. Desta forma, os animais provenientes das fazendas estão geneticamente ordenados em Grupo I, Grupo II e Grupo III. Elas podem apresentar respostas fenotípicas diferenciadas mediante às pressões ambientais, pois possuem variabilidade distinta. Isso significa que ao considerarmos, por

exemplo, a introdução de um potencial agente patogênico, condições de restrição alimentar e manejo inadequado ou ausente (De Donato et al., 2005) essas populações teriam respostas distintas o que favoreceria a sobrevivência e o sucesso reprodutivo.

A variância da frequência genotípica observada na população como um todo foi de 41%, sugerindo um bom percentual de diversidade. Porém, dentro dos grupos a variabilidade genética foi pequena, e isso possivelmente está relacionando ao processo histórico da formação dos rebanhos na região Nordeste. Pois, os bovinos nativos foram usados em cruzamentos não programados com raças exóticas na década de 80.

Britto (1998) confirmou a contaminação racial nos rebanhos de Pé-Duro através da análise cariotípica. Ela identificou os animais mestiços utilizando o perfil morfológico do cromossomo Y e dos fenótipos associados à raça Zebuína tais como, orelhas grandes, prepúcio distendido e barbela pregueada. Os resultados obtidos em nosso trabalho sustentam a existência de uma estreita variabilidade dentro do mesmo rebanho estudado por Britto (1998) que aqui corresponde ao Grupo III, ou seja, o Núcleo de Conservação da Raça Pé-Duro.

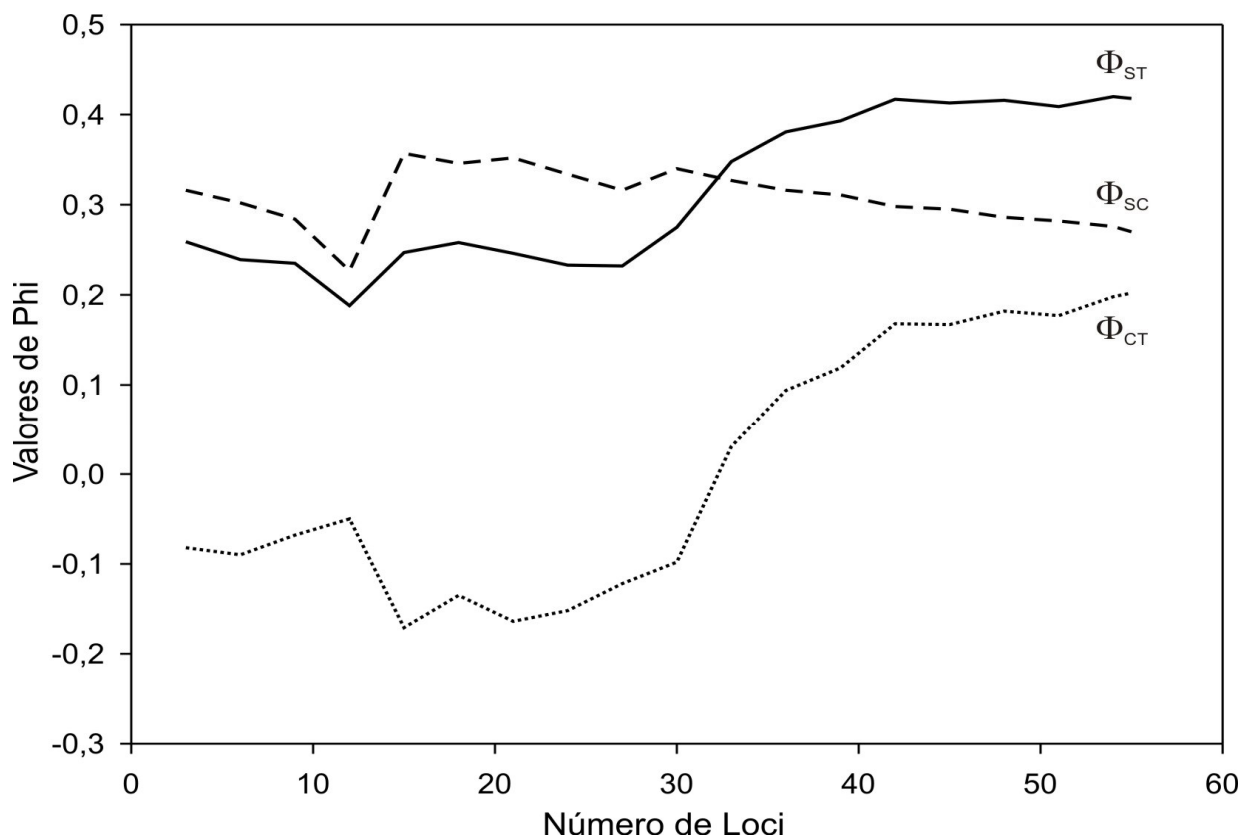
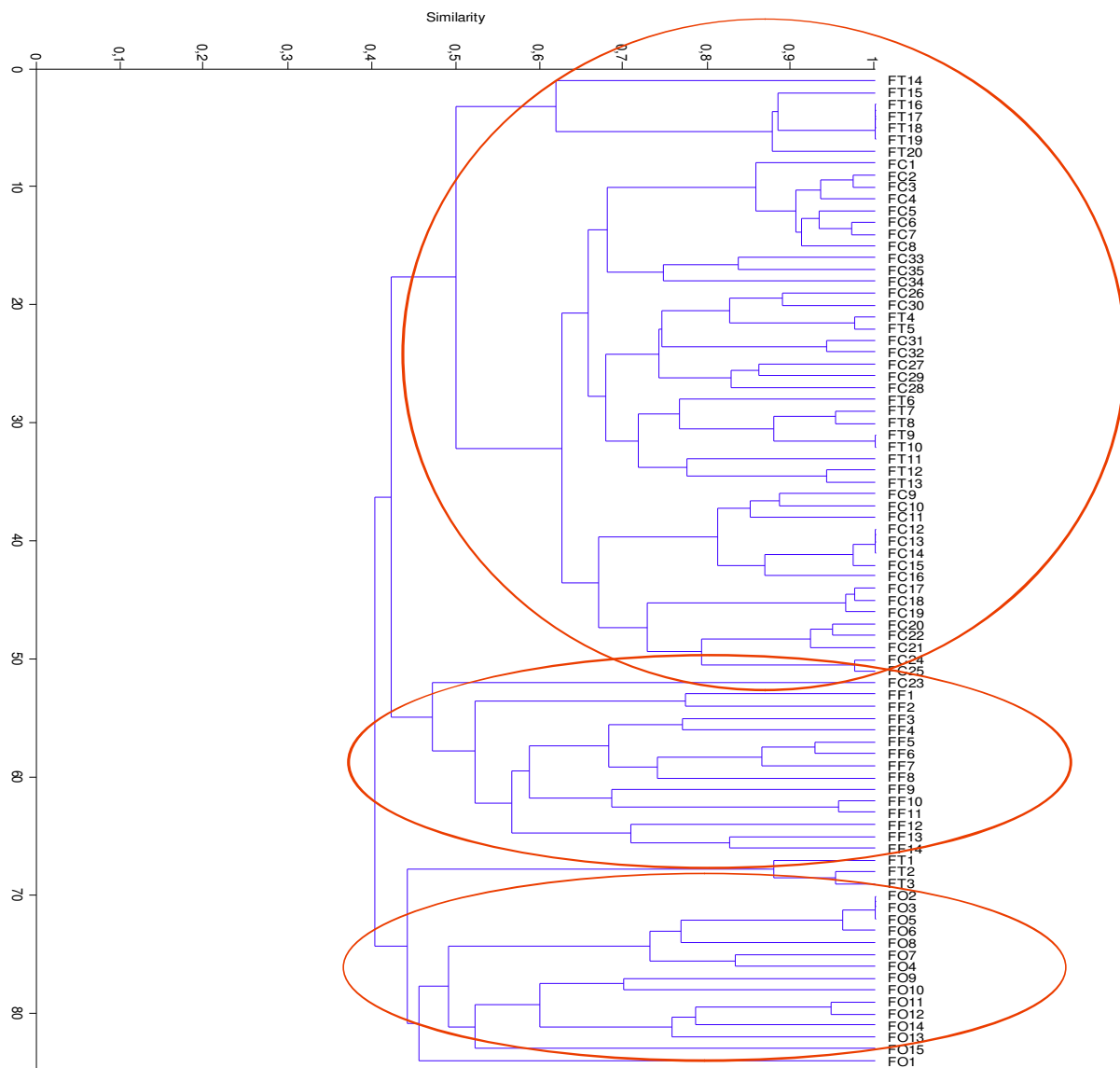


FIGURA 2. Variação das estimativas Φ_{ST} , Φ_{SC} e Φ_{CT} com marcadores microssatélites ancorados para raça Pé-Duro.

O dendograma obtido pela análise de Cluster baseada no coeficiente de similaridade Jaccard corroborou para confirmação dos dados apresentados pela análise de variância molecular (AMOVA). Nenhum indicativo forte da estrutura da população relatou qual a posição geográfica deveria ser observada e nos ramos encontram-se indivíduos de uma mesma fazenda distribuídos em diferentes posições no dendograma (Figura 3).



CLUSTER ANALYSIS (JACCARD)

Figura 3. Dendrograma gerado pelo método de UPGMA para os genótipos dos bovinos, agrupados por similaridade genética.

Os grupos observados no dendograma correspondem aos rebanhos com distribuição geográfica distintas. O Grupo III está localizado ao Sul do Piauí, região semi-árida caracterizada pelo Bioma de Caatinga. O Grupo I está ao Norte e o Grupo II ao Centro do Estado. Ambos distribuem-se em região sub-úmida seca cujo bioma é de transição.

A ampla distribuição de uma população favorece a adaptação aos ambientes específicos ao longo de muitos anos ressaltando as diferenças alélicas que são necessárias para compor uma nova população em consequência da variabilidade genética existente (Griffiths et al. 2002).

No entanto, 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 et al. (1995) confirmam que as raças nativas possuem maior variabilidade gênica que as raças exótica, ressaltando a importância de que estas sejam conservadas.

No Grupo III, os indivíduos apresentam mais similaridade que os outros grupos. Este é um núcleo de preservação da raça fundado em 1983. O rebanho inicial era formado por 81 animais provenientes de 32 fazendas piauienses e a maioria dos animais eram miscigenados. Desde então, estes animais acasalaram-se sem interferência humana tornando-se o maior rebanho de bovinos Pés-Duros do Estado com aproximadamente 220 animais.

O valor do índice de endogamia das populações que foi de (f) foi 0,45. Sugerindo a existência de cruzamentos consangüíneos e consequente alguma perda de variabilidade genética. Pois, compreende um rebanho fechado para fluxo gênico com animais de outras localidades.

Magalhães et al. (2007) ao estudarem populações comerciais de caranguejo utilizando RAPD encontra valor endogâmico de 0,72 o que corrobora com o entendimento de que populações de animais que não sofrem seleção atropica apresentam menores valores endogamicos, assim como foi verificado na raça Pé-Duro.

Embora, as populações aqui estudadas não tenham sofrido seleção artificial e acasamentos direcionados, a endogamia verificada nesses grupos pode ser compreendida pelo isolamento das populações. Especialmente para os rebanhos que se formaram com reduzido número animais e que ao longo de décadas não recebeu novos conjuntos gênicos através da entrada de bovino da raça Pé-duro.

O principal impacto da consangüinidade está na perda de variabilidade é um componente importante. Sua manutenção é essencial a sobrevivência das espécies em função disso tem-se exigido nos últimos anos medidas como o gerenciamento dos recursos genéticos.

Quando relacionados à pecuária, a variabilidade genética favorece a seleção e permite o delineamento da situação genética dos rebanhos comerciais e nativos determinando as medidas necessárias para exploração sustentável, bem como a conservação dos genótipos não selecionados (Magalhães et al., 2007).

As migrações e ausência de seleção direcionada provavelmente expliquem parte da variabilidade existente nas fazendas Convencido e Tocaia e por outro lado justifique a similaridade encontrada dentro do grupo III. Isso sugere que as populações possuem estrutura genética forte e provavelmente um dos fatores que tenha contribuído seja o distanciamento geográfico entre elas, tornando-as de alguma forma isoladas reprodutivamente. Spritze et al. (2003) afirma que de um modo geral as populações nativas de bovinos se comportam de modo panmítica.

Estes são os primeiro resultados sobre a diversidade genética e estrutura de população nativa de bovinos utilizando marcadores moleculares microssatélites ancorados. Embora, seja possível verificar a existência de uma forte estrutura populacional e afirmar sobre a diversidade genética entre os grupos para os *loci* avaliados, reconhecem-se a necessidade de utilizar outros marcadores moleculares como os microssatélites, bem como, incluir indivíduos de outras regiões da Região Nordeste para consolidar as informações sobre a estrutura genética e populacional desta raça nativa de bovinos.

Contudo, a colaboração deste trabalho consiste em confirmar a variabilidade genética da raça Pé-Duro assim com Spritze et al., (2003) sugeriram sobre as raças nativas. E constatar o potencial dos ISSRs como uma importante ferramenta molecular que poderá ser usada para acessar as marcas genéticas nos organismo que ainda não foram estudados geneticamente.

Conclusão

As populações da raça Pé-Duro analisadas com marcadores microssatélites ancorados possuem variabilidade genética significativa e alta que poderá ser utilizada em programas de melhoramento genético de outras raças e na conservação. Através da gestão genética e do manejo sustentável dos rebanhos será possível incluir os bovinos nativos do Nordeste nos sistemas de produção animal, valorizando um recurso genético local bem como o pequeno produtor do semi-árido.

O coeficiente de endogamia encontrado nas populações estudadas confirma que em a probabilidade de indivíduos herdarem os mesmos genes de descendentes comuns é mais freqüente que em populações com maior numero de indivíduos do que em pequenas populações. No entanto, a forças seletivas atuam de modo a equilibrar esses níveis endogamicos favorecendo a existência da heterozigosidade na população. Na raça Pé-Duro, é necessário que se realizem outros estudos sobre endogamia, uma vez que se verifica que a adaptação dos rebanhos se opõe a homozigose e conseqüentemente a sobrevivência em região tão inóspita para outras raças bovinas.

Referências

- ATHANASSOF, N. **Manual do criador de bovinos**. 6ed. São Paulo: Melhoramentos. p.818, 1957.
- AVISE, J.C. **Phylogeography**. Harvard University Press, Cambridge. 2000.
- AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. **Conservation genetics, case histories from nature**. Chapman and Hall, New York. 1996.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2a ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1998.
- BRITTO, C. M. C. Citogenética do Gado Pé-duro. Teresina. **EDUFPI**, 80p. 1998.
- DE DONATO, M.; MANRIQUE, R.; RAMIREZ, R.; MAYER, L.; HOWELL, C. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. **Aquaculture**, v.247, p.159-167, 2005.
- EGITO, A. A. de; ALBUQUERQUE, M. S.; MARIANTE, A. da S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2001. p. 121-126.
- EGITO, A. A. **Uso de marcadores RAPD na identificação e caracterização genética de raças bovinas existentes no Brasil**. 1995. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. v. 131, p. 479-491, 1992.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa/CENARGEM, 1998

- FOWLER, E.V.; HOLBEN, B.A.; SHERWIN, W.B.; HOEBEN, P.; TIMMS, P. Genetic variation in captive koalas (*Phascolarctos cinereus*): parentage determination and individual identification. **Biochemical Genetics**, v.36, p.193-206, 1998.
- GILBERT, J.E.; LEWIS, R.V.; WILKINSON, M.J.; CALIGARI, P.D.S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. **Theoretical and Applied Genetics**. v.98, p.1125–1131, 1999.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.: **Introdução à Genética**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 2002. 739p
- HAMMER, M.F.; KARAFET, T.M.; REDD, A.J.; JARJANAZI, H.; SANTACHIARA-BENERECETTI, S.; SOODYALL, H.; ZEGURA, S.L.; Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. **Mol Biol Evol** v.18, p.1189–1203, 2001
- HOLSINGER, K.E.; LEWIS, P.O.; DEY, D.K. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. **Molecular Ecology**, v.11, p.1157-1164, 2002.
- LACORTE, G.A.; DIAS, I. M.G.; CARVALHO, M.R.S. Extração não-invasiva de DNA de *Equus caballus*: uma avaliação de métodos. **In: V Simpósio da Sociedade Brasil de Melhoramento Animal**. Pirassununga, 2004.
- KAVALCO, K.F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L.A.C.; MOREIRA-FILHO, O. Satellite DNA sites in four species of the genus *Astuganax* (*Telostei, characiformes*) **Genetics and Molecular Biology**. v.30, n.3, p529-535. 2007.
- MAGALHÃES, M.; MARTINEZ, R. A.; GAIOTTO, F. A. Diversidade genética de *Litopenaeus vannamei* cultivado na Bahia. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, Brasília, v.42, n.8, p.1131-1136, 2007

- NEWTON, A.C.; ALLNUTT, T.R. GILLIES, A.C.M.,; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A.
Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species.
Trends in Ecology and Evolution. v.14, p.140-145, 1999.
- OLIVEIRA-NETO, J.F.; BOEGER, W.A.; PIE, M.R.; OSTRENSKY, A. HUNGRIA, D.B.
Genetic structure of populatios of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Decapoda:
Ocypodidae) at local and regional scales. **Hydrobiologia**, v.586, p.69-76, 2007.
- PEREIRA, J.C.C. 1999. **Melhoramento Genético Aplicado a Produção Animal.** Editora
FEP-MVZ. Belo Horizonte, MG. 493p.: il
- PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to
ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics.** v.98,
p.107–112, 1999.
- REIS, M.S. Dinâmica da movimentação dos alelos:subsídios para conservação e manejo de
populações naturais de plantas. **Brazilian Journal of Genetics** v. 19, p37-47, 1996.
- SPRITZE, A.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; MCMANUS. Caracterização genética
da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa
agropecuária brasileira.** v. 38, n. 10, p. 1157-1164, 2003.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. ARLEQUIN VER 2.0: a software for
population genetics data analysis, **Genetics and Biometry Laboratory**, University of
Geneva, Switzerland, 2000.
- VALENTIM, M.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M. Comparação de protocolos para
extração do DNA de *Lernaea sp.* (Copepoda: Cyclopoida). **Acta Scientiarum.**
Maringá, v. 25, n. 2, p. 219-222, 2003.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.

DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.

Nucleic Acids Research. v.18, p.6531-6535, 1990.

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

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Protocolos eficientes de extração DNA caracterizam-se pela obtenção de material genético com alto peso molecular e não fragmentado. Porém, em função do tempo de armazenamento deve se considerar a estabilidade e integridade do DNA. Os protocolos com Chelex embora, seja práticos e eficientes, não garantem a qualidade do DNA por mais de um ano.

Sugere-se a utilização de outras classes de marcadores moleculares, como os microssatélites, que são co-dominantes e altamente polimórficos. Além de, ampliar a amostra com animais provenientes de outras fazendas do Nordeste.

Os primers de microssatélites são mais específicos, requerendo maior temperatura de anelamento e só amplificam quando as regiões flaqueadoras desses *locus* são conservadas, ou seja, não apresentam variação de nucleotídeos sugerindo estabilidade gênica entre espécies que compartilha táxons divergentes, como se verifica em caprinos e bovinos. É provável que estas variações justifiquem a baixa amplificação em genoma da raça Pé-Duro por esses marcadores.

Para futuros estudos da raça recomenda-se analisar amostras provenientes do outros locais e ampliar as informações referentes a outras populações existentes no Piauí. Bem como, a genotipagem do rebanho e comparação com outras raças taurinas.

Afim de, minimizar o grau endogâmico que foi significativo na população, recomenda-se a inclusão de touros Pés-Duros de populações diferentes para monitorar acasalamentos consangüíneos.

7. ANEXOS