

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

JULIANA NOBRE VIEIRA

PADRONIZAÇÃO DE PAINEL DE MICROSSATÉLITES
PARA TESTES DE IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA E DE PATERNIDADE
E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA ESTRUTURA POPULACIONAL
DE BÚFALOS CRIADOS NO BRASIL

BELO HORIZONTE – MG
2014

Juliana Nobre Vieira

PADRONIZAÇÃO DE PAINEL DE MICROSSATÉLITES
PARA TESTES DE IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA E DE PATERNIDADE E
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA ESTRUTURA POPULACIONAL
DE BÚFALOS CRIADOS NO BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Zootecnia.

Área: Genética e Melhoramento Animal

Prof. Orientador: Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira.

Co-orientadores: Dra. Cláudia Salviano Teixeira e Dr. Marcelo Yukio Kuabara

BELO HORIZONTE - MG
2014

Vieira, Juliana Nobre, 1977-

V665p Padronização de painel de microssatélites para testes de identificação genética e de paternidade e caracterização genética da estrutura populacional de búfalos criados no Brasil / Juliana Nobre Vieira. – 2014.

71p. : il.

Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Co-orientadores: Cláudia Salviano Teixeira, Marcelo Yukio Kuabara

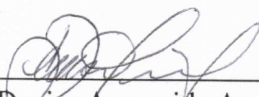
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

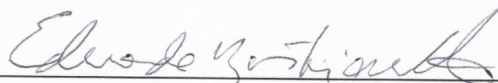
1. Búfalo – Melhoramento genético – Teses. 2. Teste de paternidade – Teses.
3. Microssatélites (Genética) – Teses. I. Oliveira, Denise Aparecida Andrade de.
II. Teixeira, Cláudia Salviano. III. Kuabara, Marcelo Yukio. IV. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636. 291 082

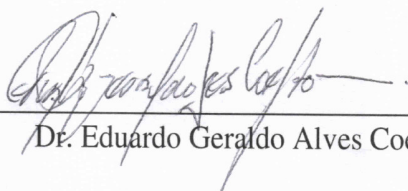
Tese defendida e aprovada, em 08 de maio de 2014, Pela Comissão Examinadora constituída por:



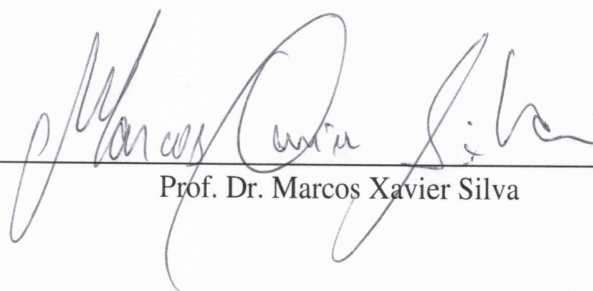
Profa. Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira
Orientadora



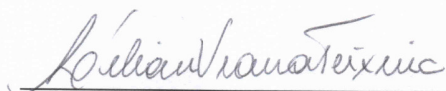
Dr. Eduardo Bastianetto



Dr. Eduardo Geraldo Alves Coelho



Prof. Dr. Marcos Xavier Silva



Profa. Dra. Lilian Viana Teixeira

Dedico aos meus pais.

Tarefa cumprida, papás!

AGRADECIMENTOS

À professora Denise Aparecida Andrade de Oliveira pela plena confiança em mim.

Ao Eduardo e Cláudia por sempre me auxiliarem.

À Dênea, por tirar minhas dúvidas finais da análise da genética de populações.

Às minhas eternas e amadas amigas, Dani, Kika e Rê por estarem comigo de longe, de perto, de mais ou menos. Enfim, de qualquer jeito e lugar.

À Kelly e à Rê por me assessorarem na minha “folga” no inglês.

Aos meus mentores espirituais que sempre me acompanham, em especial meu querido e amado pai espiritual, Boiadeiro Roberto Santiago.

A toda minha família que mesmo só entendo que o teste de paternidade identifica quem são os pais e que a tal da consanguinidade não é nada boa... torceram por mim.

À *Universidad de Antioquia* – UdeA - por me aceitar como estagiária por 3 longos e curtos meses. Agradeço ao meu Tutor prof. Henry Cardona e a todos que me ajudaram e me ensinaram a danada da estatística, principalmente à Paula Andrea Ángel Marin

Agradeço também ao prof. Jonas que me deu uma “forcinha básica” pra minha ida à UdeA e à Heloisa, secretária da Pós, por me ajudar em tudo e, é claro, por me tolerar (rsrs).

À FAPEMIG /TCT 12.020/2009, INCT de Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira – CNPq (573899/2008-8) e FAPEMIG-APQ 0084/08 e Emenda Parlamentar - Ministério da Ciência e Tecnologia (processo nº 23072.003374/08-51) por financiarem o projeto.

À CAPES/REUNI pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	RESUMO	11
	ABSTRACT	12
	INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO I	Origem bubalina no Brasil	15
1.	Introdução	15
2.	Origem bubalina	15
3.	Demografia bubalina no Brasil	17
4.	Referência Bibliográfica	19
CAPÍTULO II	Padronização de painel de marcadores microssatélites para testes de identificação genética e de paternidade bubalina	21
	Resumo	21
	Abstract	22
1.	Introdução	23
2.	Teste de paternidade	24
3.	Eficiência de marcadores microssatélites para teste de paternidade	25
4.	Eficácia e exatidão de He, PIC e P em análises de paternidade	27
5.	Material e Métodos	29
5.1.	Animais e extração de DNA	29
5.2.	Marcadores microssatélites	31
5.3.	Análise estatística	32
6.	Resultados e Discussão	32
6.1.	Desenvolvimento de painel de microssatélites	32
6.2.	Análise dos 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG/2010 para cada grupo bubalino	33
6.3.	Análise dos 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG/2010 para a população como um todo	38
6.4.	Padronização do painel principal de microssatélites para teste de identificação genética e de paternidade	40
6.5.	Padronização do painel extra para teste de identificação genética e de paternidade	42
7.	Conclusão	43
8.	Referência Bibliográfica	43

CAPÍTULO III	Caracterização genética da estrutura populacional de búfalos criados no Brasil	48
	Resumo	48
	Abstract	49
1.	Introdução	50
2.	Estrutura populacional	51
3.	Material e Métodos	53
3.1.	Animais e extração de DNA	53
3.2.	Marcadores microssatélites	54
3.3.	Análise estatística	54
4.	Resultados e Discussão	55
4.1.	Variabilidade genética	55
4.2.	Distância genética entre os grupos bubalinos	61
5.	Conclusão	68
6.	Referência Bibliográfica	68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Efetivo do rebanho bubalino, nas cinco regiões do Brasil, em 31/12/2013	18
----------	---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Relação dos búfalos analisados e a localização geográfica	30
Tabela 2	Relação dos 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG/2010	31
Tabela 3	Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores moleculares analisados em 190 búfalos da grupo Murrah	33
Tabela 4	Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores moleculares analisados em 185 búfalos da grupo Mediterrâneo	34
Tabela 5	Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores moleculares analisados em 58 búfalos da grupo Jafarabadi	35
Tabela 6	Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores moleculares analisados em 76 búfalos da grupo Carabao	36
Tabela 7	Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores moleculares analisados no grupo de Mestiços	37
Tabela 8	Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 microssatélites analisados nos cinco grupos bubalinos criados no Brasil	39
Tabela 9	Relação dos dados da variabilidade genética do painel principal composto por 13 marcadores microssatélites em búfalos criados no Brasil	41
Tabela 10	Comparação das análises dos painéis com 13 e 20 marcadores microssatélites	42
Tabela 11	Relação dos dados da variabilidade genética do painel auxiliar composto por sete marcadores microssatélites nos 590 búfalos criados no Brasil	43

CAPÍTULO III

Tabela 1	Relação dos búfalos analisados e a localização geográfica	58
Tabela 2	Parâmetros genéticos dos 20 marcadores microssatélites nos 590 búfalos criados no Brasil	60
Tabela 3	Parâmetros genéticos por grupo bubalino criado no Brasil	61
Tabela 4	Relação da frequência dos alelos privados por grupo de búfalos do Brasil	62
Tabela 5	Relação dos microssatélites e seus alelos nos búfalos de Rio (Jafarabadi, Mediterrâneo, Mestiço e Murrah) e de Pântano (Carabao) criados no Brasil	64
Tabela 6	Distância (abaixo da diagonal) e similaridade (acima da diagonal) genética entre os grupos bubalinos do rebanho brasileiro	65
Tabela 7	Proporção de indivíduos em cada grupo para $\Delta K=2$	69
Tabela 8	Proporção de indivíduos em cada grupo para $\Delta K=3$	69
Tabela 9	Proporção de indivíduos em cada grupo para $\Delta K=5$	70

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I

Gráfico 1	Número de cabeças bubalinas por continente	17
Gráfico 2	Efetivo do rebanho bubalino brasileiro, de 2007 a 2013	18

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

Figura 1	Porcentagem da variância molecular obtidos pela AMOVA entre os cinco grupos bubalinos	66
Figura 2	Representação espacial da relação dos indivíduos por subpopulação baseada nos resultados da Análise de Correspondência Fatorial	67
Figura 3	Dendrograma caracterizando total separação entre búfalos de Pântano (Carabao) e de Rio (Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Mestiços), construído baseado na distância genética D_A (Nei's, 1972). Os valores de reamostragem genética estão presentes no dendograma	67
Figura 4	Análise da estrutura dos grupos bubalinos por meio do método <i>Bayesiano</i> . K é o número de grupos formados ($K=2, 3$ e 5). As cores representam os <i>clusters</i> que são os grupos bubalinos estabelecidos	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
AFC	Análise Fatorial de Correspondência
AMOVA	Análise de Variância Molecular
Ar	Riqueza alélica
D_A	Distância genética de Nei
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EHW	Equilíbrio de <i>Hardy-Wienberg</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FM	Fêmeas mestiças
Fis	Coefficiente de endogamia do indivíduo na subpopulação
Fit	Coefficiente de endogamia do indivíduo na população total
Fst	Coefficiente de endogamia da subpopulação em relação à população total
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
ISAG	<i>International Society of Animal Genetic</i>
K	Número de grupos formados
LA	Animais de livro aberto
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
Na	Diversidade alélica ou frequência alélica
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pPCR	Produtos da PCR
PE	Probabilidade de exclusão de falso parentesco
PE-1	Probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado
PE-2	Probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados
PE-3	Probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos
PIC	Conteúdo de informação polimórfica
PCOC	Animais puros por cruzamento de origem conhecida
PCOD	Animais puros por cruzamento de origem desconhecida
PO	Animais puros de origem
RG	Registro Genealógico
SRG	Serviço de Registro Genealógico
Ta	Número total de alelos

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi a padronização do painel de microssatélites para testes de identificação genética e de paternidade bubalina, bem como o uso do mesmo em estudo de caracterização genética, por meio das análises de variabilidade e distância entre as quatro raças bubalinas reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (Carabao, Jafarabadi, Mediterrânea e Murrah) e de mestiços de búfalos criados no Brasil. Foram avaliados 590 búfalos por meio de 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG/2010 (*International Society Animal Genetics*). O painel principal padronizado com 13 marcadores microssatélites apresentou elevado PIC (0,6). Os dados confirmam a confiabilidade e a eficiência dos marcadores analisados tanto para testes de identificação genética quanto para o de genealogias. Para a caracterização genética de bubalinos foram utilizados os 20 marcadores. Foi observado pequeno déficit de heterozigosidade ($Fis=0,077$), porém as populações apresentaram estrutura genética intermediária ($Fst=0,163$). Houve desvio de HW em 15 dos 20 marcadores microssatélites. Estes dados podem ser devido ao reduzido número de propriedades, à seleção de touros, ao elevado índice de endogamia e ao cruzamento entre búfalos de Rio e de Pântano, quando foram introduzidos no Brasil. O resultado do estudo da caracterização genética da estrutura populacional determinou a formação de dois *clusters*, ou seja, total separação entre as duas variedades bubalinas, búfalos de Rio (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*) e de Pântano (*B. bubalis* var. *kerebau*). Estas informações sobre a caracterização genética são necessárias para programas de conservação genética e para um adequado programa de melhoramento genético bubalino.

Palavras-chave: bubalinos brasileiros, teste de DNA, caracterização genética, marcadores microssatélites, estrutura populacional.

ABSTRACT

The aim of this study was to standardize a microsatellites panel for buffalo genetic identification test as well as the study of genetic characterization by means of analyzes of variability and distance among the four buffalo breeds recognized by the Brazilian Association of Builders Buffaloes (Carabao, Jaffarabadi, Mediterranean and Murrah) and crossbred buffaloes raised in Brazil. Were evaluated 590 buffaloes using 20 microsatellite markers recommended by ISAG/2010 (International Society for Animal Genetics). The panel of 13 microsatellite markers developed exhibited high PIC (0.6). The data confirm the reliability and efficiency of the markers analyzed for genetic identification tests as to the genealogy. To evaluate the genetic characterization were observed a low heterozygosity deficit ($F_{is} = 0.077$), but the populations had intermediate genetic structure ($F_{st} = 0.163$). There was deviation from HW in 15 of 20 microsatellite markers. These data may be due to the small number of properties, the selection of bulls, the high level of inbreeding, the possibility of sharing the same common ancestor and the Buffaloes cross between Rio and Marsh, when introduced in Brazil. The population structure determined $k = 2$, featuring full separation between the two varieties of buffaloes, Bubalus bubalis var bubalis and B. bubalis var. kerebau, River and Wamp buffaloes, respectively. This information on the genetic characterization are necessary for the development of genetic identification and paternity testing for complementation of genetic conservation programs and an appropriate program of buffalo breeding.

Key-words: *Brazilian buffaloes, DNA testing, genetic characterization, microsatellite markers population structure.*

INTRODUÇÃO GERAL

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é uma espécie doméstica que vem ganhando espaço no cenário da pecuária nacional e também do público em geral devido às propriedades saudáveis de seus derivados como a carne que apresenta 55% menos calorias e 40% menos colesterol que a carne bovina.

No Brasil, a Embrapa, em 2013, apontou um crescimento de 10 a 12% ao ano no rebanho bubalino em relação ao rebanho bovino e os altos índices produtivos vêm atraindo cada vez mais criadores (IBGE). Entretanto, até o momento, não há registros sobre a caracterização genética bubalina no Brasil que possam vir a auxiliar nos programas de melhoramento genético animal, como é o caso de teste de DNA.

A análise de DNA tem como um dos objetivos a identificação genética do indivíduo como, por exemplo, o teste de paternidade. O perfil genético é obtido pela análise do material genético extraído a partir de diferentes tecidos (como por exemplo: folículo piloso, sangue, sêmen, tecido, dente, osso ou saliva).

Para a realização do teste de DNA, faz-se necessário estudo prévio de um painel de marcadores microssatélites, que devem ser marcadores co-dominantes, abundantes no genoma, altamente informativos e multialélicos, que permitem identificar geneticamente indivíduos e populações. A composição genética de uma população pode ser obtida a partir do cálculo das frequências alélicas para cada marcador microssatélite utilizado.

Com auxílio de programas estatísticos são gerados dados tanto da variabilidade genética (frequência alélica, número total de alelos, número efetivo de alelos, probabilidade de exclusão de falso parentesco, conteúdo de informação polimórfica, heterozigosidades observada e esperada, Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*) quanto da distância genética (estatística-F ou índice de endogamia, análise da variância molecular/AMOVA e método *Bayesiano* que fornece dados sobre a pureza das raças). Dessa maneira, são geradas informações sobre a magnitude de diferenciação e das relações de variabilidades genéticas inter e intra-raciais e entre populações. Obtendo-se assim, a caracterização, a estrutura genética da população, da raça, sendo este denominado estudo de Genética de Populações.

Grande impacto do sistema reprodutivo pode ocorrer quando este é realizado de maneira incorreta podendo aumentar a taxa de endogamia e, conseqüentemente a homozigose, ocorrendo fixação e expressão de genes indesejáveis na população. O controle da endogamia pode ocorrer com o auxílio da identificação genética.

Deste modo, há a necessidade de maior controle dos *pedigrees* dos rebanhos de animais de interesse zootécnico, via testes de DNA, pois a existência de erros na genealogia pode

comprometer o ganho genético estimado para a progênie de um rebanho em programas de melhoramento animal, ocasionando perdas econômicas.

Em búfalos, um grande número de microssatélites está sendo caracterizado e mapeado. No entanto, pouco se conhece sobre sua efetividade em testes de identificação genética e de paternidade, como já ocorre em bovinos, caprinos, equinos e ovinos.

Portanto, este trabalho teve como objetivo padronizar um painel de marcadores microssatélites com a finalidade de seu emprego nos testes de identificação genética e controle de genealogias em bubalinos, como os já existentes para outras espécies de animais. Além disso, caracterizar geneticamente a estrutura populacional das quatro raças bubalinas reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, ABCB (Carabao, Jafarabadi, Mediterrânea e Murrah) e mestiços de búfalos criados no Brasil.

CAPÍTULO I - Origem bubalina no Brasil

1. Introdução

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) foram domesticados no terceiro milênio a.C., na Mesopotâmia, e no segundo milênio a.C., na China. Durante a Idade Média, os búfalos foram introduzidos na Europa, extremo Oriente e África. No Brasil, eles chegaram entre 1870 e 1890, através da Ilha de Marajó, no estado do Pará (Zava, 1946). No Brasil, estes animais têm uma história recente, ao se comparar com o tempo de exploração bovina em nosso país. As primeiras criações de búfalos surgiram com a chegada dos primeiros animais ao Brasil, há cerca de um século. Das várias raças existentes no mundo, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, ABCB, reconhece somente quatro: Carabao, Jafarabadi, Mediterrânea e Murrah (ABCB, 2010). O rebanho nacional vem crescendo de maneira constante e significativa e, o que é mais representativo, em todas as regiões do País, o que derrubou o estigma de que a criação deste animal só era possível na região Norte do Brasil na qual, de fato, possui o maior rebanho (IBGE, 2013). Apesar do crescente aumento do rebanho bubalino, pouco se sabe sobre sua variabilidade genética que é necessária para o desenvolvimento de testes de identificação genética e de confirmação de genealogia, bem como a utilização do mesmo para estudo da genética de populações.

2. Origem bubalina

O ancestral mais provável do búfalo doméstico é o búfalo selvagem indiano Arnee ou *wild buffalo*, *Bubalus arnee* (Keer), em 1792, que habitava o Sul da África e, provavelmente, o Norte da Índia, Sri Lanka e Indochina (Zava, 1946; Cockrill, 1974). Segundo Zhang et al. (2011), há forte evidência de que tanto os Búfalos de Rio quanto os de Pântano são descendentes do *B. arnee*, sendo que evidências genéticas apontam claramente domesticações independentes entre ambas as variedades. Possivelmente, os búfalos foram domesticados durante o terceiro milênio a.C., na Mesopotâmia e vales Hindus e, na China, durante o segundo milênio a.C. Muitas das raças existentes hoje, com suas características bem definidas, desenvolveram-se por meio de seleção natural durante um longo período (Cockrill, 1974).

A chegada dos búfalos no Brasil foi caracterizada por entradas de pequenos lotes de animais em épocas distintas. A primeira introdução foi de búfalos Carabao ou Rosilhos, se deu na Amazônia, em 1890. Em fevereiro de 1895, são confirmadas outras importações de búfalos pretos ou da raça Mediterrânea advindos de Roma, para a Ilha de Marajó, de melhores aptidões leiteiras e comportamento mais dócil (Zava, 1946; CNPL, 1958; Santiago, 1960).

Em meados de 1902, houve a entrada de novo lote de búfalos pretos ou Mediterrâneos, de origem italiana. Em 1906, búfalos do tipo “Rosilho”, mais tarde identificados como Carabao, foram importados para a ilha de Marajó e, atualmente esta raça é utilizada em quase todo o oriente e na região norte do Brasil. Em 1907, foram introduzidos, em Alagoas, búfalos castanhos, pretos e com manchas brancas, também denominados de Carabao e provavelmente vindos do sudeste da Ásia. Nos anos seguintes, foram realizadas outras importações por criadores da Ilha de Marajó, do Baixo Amazonas e de outros estados do Brasil (Santiago, 1960; Albuquerque et al., 2006). Nesta época, houve rápida propagação da espécie e surgimento de considerável mestiçagem entre búfalos pretos e “Rosilhos” realizada pelos pecuaristas Marajoaras (CNPL, 1958; Santiago, 1960). No Sul do Brasil, os búfalos foram introduzidos em 1908, mas desapareceram sem formar rebanho por terem sido poucos animais (CNPL, 1958).

Em 1918, foram importados da Índia dois casais de búfalos, com predominância de sangue Jafarabadi, para Uberaba/MG, cujos criadores mantiveram esta raça pura. Produtores de gado zebu introduziram em Franca/SP, em 1920, dois casais da raça Murrah de pureza racial incerta, pois sua criação era em conjunto com os da raça Jafarabadi, em Uberaba. Em 1947, em São Miguel Arcanjo/SP, foram adquiridos dois machos e 20 matrizes novas, depois mais 10 fêmeas da raça Jafarabadi compradas em Cássia/MG e 30 vindas da Fazenda de Matarazzo, portanto da mesma origem de seu rebanho (Santiago, 1960).

Por muito tempo, com exceção da região de Uberaba e de São Miguel Arcanjo, que mantiveram seus animais da raça Jafarabadi puros (importações de 1918 e 1947), a maior parte dos criadores dispunha de animais cruzados. Alguns animais apresentavam características mais definidas de origens indiana ou italiana (Santiago, 1960; Marques, 2000; Albuquerque et al., 2006).

A partir da importação de 20 búfalos indianos puros e rigorosamente selecionados, das raças Murrah e Jafarabadi, em 1962, para os estados de São Paulo e Paraná, é que a bubalinocultura vem se consolidando como uma opção pecuária relevante no Brasil. Em 1989, foram feitas importações de animais da raça Mediterrânea, da Itália, para os estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Bahia, da mesma forma que sêmen de reprodutores Murrah e Mediterrâneo foram importados pela Embrapa, da Itália e da Bulgária (Santiago, 1960; Albuquerque et al., 2006).

Estes dados demonstram quão diversificada é a origem dos búfalos brasileiros (embora poucos animais tenham dado origem ao efetivo populacional existente, hoje, no rebanho nacional. Segundo Albuquerque et al. (2006) e Marcondes et al. (2011) este fato poderia explicar os elevados índices de consanguinidade, especialmente no rebanho “elite”, bem como nos demais rebanhos. Além de, possivelmente, possuírem o mesmo ancestral comum, o búfalo Arnee (Zhang et al., 2011).

Apesar de serem conhecidas 18 raças bubalinas na Índia, a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) reconhece apenas quatro: a Mediterrânea (de origem italiana, dupla-aptidão, carne e leite), a Murrah (de origem indiana, aptidão leiteira) e a Jafarabadi (de origem indiana, dupla-aptidão, carne e leite), denominados Búfalos de Rio (*B. bubalis* var. *bubalis*) e a Carabao (de origem asiática, norte das Filipinas, dupla aptidão, carne e tração), pertencente ao grupo de Búfalos de Pântano (*B. bubalis* var. *kerebau*) (ABCB, 2010).

Portanto, o Búfalo de Rio é caracterizado como búfalo doméstico (cariótipo $2n=50$ cromossomos), engloba rebanhos da Índia, Paquistão, China, Turquia, de vários países da América e da Europa. Já o Pântano (*swamp buffalo*), encontrado na Malásia, Indonésia, Filipinas, Ceilão e Tailândia, apresenta cariótipo $2n=48$. O híbrido de Carabao com as demais raças bubalinas apresenta cariótipo $2n=49$ acarretando baixas taxas de fertilidade (Zava, 1946; Cockrill, 1974; Marques, 2000; Albuquerque et al., 2006). Este hibridismo ocorre devido ao cruzamento entre indivíduos da mesma espécie, porém entre subespécies diferentes.

3. Demografia bubalina no Brasil

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2013), a população mundial de búfalos foi estimada em pouco mais de 192 milhões de cabeças em 2011, sendo que cerca de 187.359 milhões, 3.819, 1.205 e 0.372 milhões, encontram-se, respectivamente, em países do continente asiático, africano, americano e europeu (Gráfico 1).

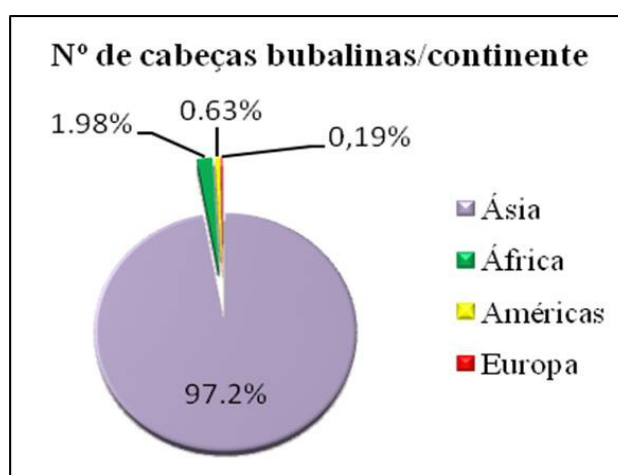


Gráfico 1: Número de cabeças bubalinas por continente. **Fonte:** FAOSTAT (2013)

O Brasil é o maior centro de criação de búfalos das Américas, totalizando 1.261.922 cabeças, em 2012 (IBGE, 2013). O Gráfico 2 representa o crescimento gradativo da população bubalina no Brasil, a partir de 2007 (IBGE, 2007- 2013).

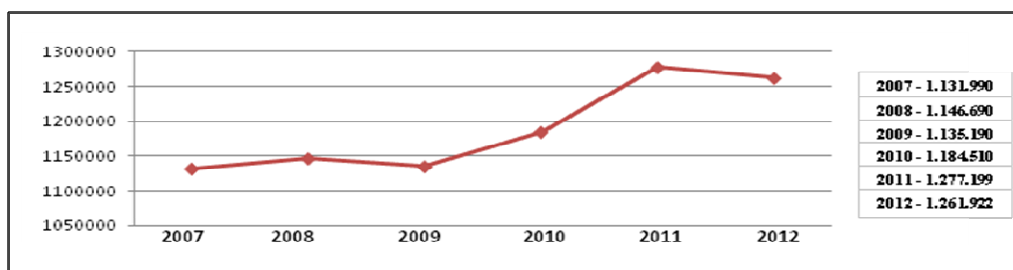


Gráfico 2: Efetivo do rebanho bubalino brasileiro, de 2007 a 2013

Fonte: IBGE (2007-2013) - modificado

Conforme apresentado na Tabela 1, o rebanho nacional vem se consolidando em todas as regiões do país, derrubando o estigma de que a criação deste animal só era possível na região Norte do Brasil que, de fato, possui o maior rebanho (IBGE, 2013).

Tabela 1: Efetivo do rebanho bubalino, nas cinco regiões do Brasil, em 31/12/2013

Região	Nº Cabeças	Porcentagem (%)
Norte	808.133	64,04
Sudeste	144.986	11,49
Nordeste	122.263	9,69
Sul	113.192	8,97
Centro-Oeste	72.598	5,81
TOTAL	1.261.922	100

FONTE: IBGE (2013) – adaptado

Estes números indicam que o quadro nacional da bubalinocultura tende a mudar a médio e longo prazo. Dessa forma, há necessidade de mais estudos nesta espécie, como já vem ocorrendo, nas mais diversas áreas, como na biotecnologia da reprodução, doenças patológicas e hereditárias, identidade genética e controle qualidade de carne, leite e derivados. Determinando, assim, um registro apropriado do rebanho nacional, uma vez que o Brasil detém o maior rebanho da espécie do Ocidente (Vieira et al., 2011).

Diante desse cenário, a caracterização genética é um pré-requisito essencial para estabelecer programas de conservação genética, pois permite analisar os níveis de variabilidade genética entre e dentro de populações e conhecer a atual estrutura genética da raça ou de seus remanescentes (Pires, 2012). Desta maneira tem-se o controle do volume de informações sobre a estrutura populacional e o que se deve ou não fazer para se conservar genética e adequadamente determinada raça.

Na espécie bubalina (*B. bubalis*) grande número de microssatélites está sendo caracterizado e mapeado em todo o mundo, no entanto, pouco se conhece sobre sua efetividade em testes de identificação genética bubalina e de confirmação de genealogia, bem como sobre utilizá-lo em estudos da caracterização genética da estrutura de populações de búfalos criados no Brasil. Assim sendo, faz-se necessário a padronização de um painel de marcadores microssatélites com a finalidade de testes de identificação genética e de genealogias, bem como a validade efetivação internacional do mesmo.

4. Referência Bibliográfica

ABCB (2010) - <http://www.bufalo.com.br/>

ALBUQUERQUE, M.S.M.; EGITO, A.A.; PAIVA, S.R. *et al.* Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: uma revisão de literatura. EMBRAPA, Brasília, Documento 166, 23p., 2006.

CNPL – Comissão Nacional da Pecuária de Leite. A criação de búfalos para fomento da produção leiteira na Amazônia. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 146p., 1958.

COCKRILL, W.R. The husbandry and health of the domestic buffalo. *FAO*, Rome, 993p., 1974.

FAO (2013). http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#VISUALIZE. acessado em 28/maio/2013.

IBGE (2007 E 2013) – <http://www.ibge.gov.br/>

MARCONDES, C.R.; MARQUES, J.R.F.; ARAÚJO, C.V. *et al.* Estruturação de dados para avaliação genética de bubalinos em rebanhos – Núcleo Pará: Resultados preliminares. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2011.

MARQUES, J. R. F. 500 perguntas 500 respostas – Búfalos: o produtor pergunta. a Embrapa responde. Brasília : SCT / EMBRAPA, v.1, p.167, 2000.

NASCIMENTO, C.; CARVALHO, L.O.M. Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações. EMBRAPA-SPI, Brasília, DF, 403p., 1993.

PIRES, D.A.F. Caracterização genética de remanescentes da raça equina nordestina em mesorregiões dos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí através de marcadores microssatélites. 2012. 101f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia. Área: Produção Animal.

SANTIAGO, A.A. Histórico: Fundação, Pioneiros, Importadores, Estudo e Fomento. ABCB, São Paulo, 9p., 1960. Disponível em http://www.bufalo.com.br/info_criador.html. Acessado em 20/agosto/2012.

VIEIRA, J.N. et al. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. PUBVET. Londrina. v. 5, n. 2, Ed. 149, Art. 1003. 2011.

ZAVA, M. Produção de búfalos. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 256p., 1946.

ZHANG, Y.; VANKAN, D.; ZHANG, Y. et al. Genetic differentiation of water (*Bubalus bubalis*) populations in China. Nepal and south-east Asia: inferences on the region of domestication of the swamp buffalo. *Anim. Genet.*, 42, p.569-575, 2011.

CAPÍTULO II – Padronização de painel de marcadores microssatélites para testes de identificação genética e de paternidade bubalina

RESUMO

Atualmente, o tamanho do rebanho bubalino brasileiro (*Bubalus bubalis*) é de 1.261.922. Apesar deste fato, o controle genealógico ainda é um dos problemas em programas brasileiros de seleção e de melhoramento animal. O teste de DNA é importante para que se possa desenvolver um sistema que permita a certificação genealógica, bem como as inegáveis identificações individuais e de paternidade. O presente estudo teve como objetivo padronizar um painel de marcadores microssatélites para testes de identificação genética e controle de genealogia em búfalos criados no Brasil por meio de 20 microssatélites recomendados pela ISAG/2010. Foram avaliados 590 búfalos (Jafarabadi, n=58; Mediterrânea, n=185; Murrah, n=190; Carabao, n=76 e Mestiços, n=81). Foram detectados 219 alelos para a população como um todo, sendo que o número de alelos variou de cinco (CYP21) a 31(ETH3). Os dados médios da He (0,768) e PIC (0,739) confirmaram elevado grau de polimorfismo. Houve desequilíbrio de HW em 15 dos 20 microssatélites analisados, possivelmente pelo reduzido número de rebanhos analisados, seleção de touros para o uso de inseminação artificial e, conseqüente déficit de heterozigosidade (Fis=0,077), ou seja, devido à endogamia existente nos rebanhos estudados. O valor médio da PE foi de 99,99%, confirmando a eficácia dos microssatélites para testes de DNA. O painel definido como padrão foi composto por 13 marcadores microssatélites sendo encontrados 125 alelos com variação de cinco (CYP21) a 18 (CSSM47), com média de 9,62 por microssatélite. Todos os marcadores microssatélites foram altamente polimórficos, com PIC variando de 0,613 (CYP21) a 0,863 (BM757), obtendo média de 0,736. Confirmando estes dados têm-se os valores médios das heterozigosidades (Ho=0,642; He=0,766) e o da probabilidade de exclusão de falso parentesco (PE=99,99%). O painel proposto mostrou-se eficaz em testes de identificação genética e de paternidade em búfalos criados no Brasil.

Palavras-Chave: *Bubalus bubalis*, testes de identificação genética e de paternidade, painel de marcadores microssatélites

ABSTRACT

Currently , the size of the Brazilian herd buffaloes (*Bubalus bubalis*) is 1.261.922. Despite this fact, the genealogical control is still one of the problems in Brazilian programs of selection and animal breeding. DNA testing is important so that we can develop a system that allows family certification as well as the undeniable individual identification and paternity. The present study aimed to standardize a panel of microsatellite markers for genetic identification and control genealogy tests in buffaloes raised in Brazil by 20 microsatellites recommended by ISAG/2010. 590 buffaloes were evaluated (Mediterranean, n=185; Murrah, n=190; Carabao, n=76, Crossbred, n=81 and Jaffarabadi, n=58). 219 alleles were detected in the population as a whole, with the number of alleles ranged from five (CYP21) to 31 (ETH3). Average values of H_e (0.768) and PIC (0.739) confirmed a high degree of polymorphism. Was HW disequilibrium in 15 of the 20 analyzed microsatellite possibly due to the small number of herds analyzed , selection of bulls for artificial insemination and consequent deficit of heterozygosity ($F_{is}=0.077$) , or due to inbreeding in the herds studied . The average PE was 99.99%, confirming the effectiveness of microsatellites for DNA testing . The panel developed is composed of 13 microsatellite markers and found 125 alleles ranging from five (CYP21) to 18 (CSSM47) per locus, average 9.62. All microsatellite markers were highly polymorphic with PIC ranging from 0.613 (CYP21) to 0.863 (BM757), obtaining an average of 0.736. These data have the mean values of heterozygosity ($H_o=0.642$, $H_e=0.766$) and the probability of false parentage exclusion ($PE = 99.99\%$). However, it was observed HW deviation in 10 markers and the presence of inbreeding ($F_{is}=0.042$), but these data did not influence the allelic polymorphism . In view of the proposed by this study, the panel developed is effective genetic testing in paternity identification and buffaloes raised in Brazil .

Key words: *Bubalus bubalis*, genetic identification and paternity tests, microsatellite markers panel

1. Introdução

No Brasil, são reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) quatro raças pertencentes à espécie *Bubalus bubalis*, a qual é dividida em dois grupos: Búfalos de Rio (*B. bubalis* var. *bubalis*), raças Mediterrânea, Murrah e Jafarabadi e, Búfalos de Pântano (*B. bubalis* var. *kerebau*), raça Carabao que encontra-se conservada no Brasil, porém em vias de extinção (Paulin E Ferreira Neto, 2008; Albuquerque et al., 2006).

Atualmente, a população de búfalos do Brasil é de aproximadamente 1.261.922 (IBGE, 2013). Apesar deste fato o controle genealógico ainda é um dos pontos fracos dos programas de seleção e melhoramento genético bubalino, no Brasil (Vieira et al., 2011).

Sabe-se que erros de *pedigree* em programas de melhoramento animal podem vir a introduzir erros nas estimativas de herdabilidade e nos valores de seleção genética estimados para a progênie do rebanho, implicando em perdas reprodutivas, produtivas e econômicas (Paiva et al., 2004; Jakhesara et al. 2012). Por isso, tanto a identificação genética quanto a verificação de parentesco são ferramentas valiosas para o sucesso dos programas de testes de progênie.

Os testes de paternidade são baseados no princípio da exclusão genética, ou seja, a base do teste está em mostrar que um determinado animal não poderia ser o progenitor do produto em questão. Como suporte, este teste tem a herança mendeliana, ou seja, todos os alelos apresentados na progênie têm de estar na mesma posição dos alelos dos pais, sendo necessário estabelecer, os de origem materna e, em seguida, os de origem paterna. Caso dois alelos, no mínimo, correspondentes a dois diferentes microssatélites não sejam compartilhados, é causa de exclusão de paternidade (Regitano E Veneroni, 2009).

Testes de identificação genética e de paternidade com uso de microssatélites já estão sendo realizados para outras espécies de interesse zootécnico, bovinos, caprinos, equinos e ovinos. Porém, em búfalos grande número de marcadores microssatélites está sendo caracterizado e mapeado somente para a análise de diversidade genética (Kathiravan et al., 2012). Ou seja, pouco se conhece sobre sua efetividade em testes de identificação genética e de paternidade.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo padronizar um painel de marcadores microssatélites para testes de identificação genética e controle de genealogia em búfalos criados no Brasil, por meio de 20 microssatélites recomendados pela *International Society of Animal Genetic*, em 2010 (ISAG/2010).

2. Teste de paternidade

O teste de paternidade consiste na análise do patrimônio genético que um filho herdou de seus pais, procurando efetuar uma comparação entre diferentes perfis de distribuição alélica. O teste se baseia na herança mendeliana, onde todos os alelos apresentados na progênie têm de estar na mesma posição dos alelos dos pais, sendo necessário estabelecer, os de origem materna e paterna. Caso haja discordância entre os genótipos dos supostos progenitores e do produto em, pelo menos, dois diferentes microssatélites é caracterizada exclusão de paternidade (Regitano E Veneroni, 2009; Wischral E Gomes Filho, 2009).

O DNA é amplificado utilizando a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que permite a amplificação seletiva de microssatélites em segmentos de DNA específicos para cada espécie. Após esta fase, o produto da PCR sofre corrida eletroforética em sequenciador automático e, em seguida, as análises são realizadas com o auxílio do programa computacional, o *GeneMapper*. Dessa forma, é possível identificar pelos tamanhos dos fragmentos, em pares de bases (pb), os alelos de cada indivíduo analisado sendo esta técnica altamente precisa e específica (Dolinsky E Pereira, 2007; Regitano E Veneroni, 2009).

Estão disponíveis hoje, testes de proficiências internacionais para as espécies bovina, canina, caprina, equina e ovina. Estes testes de identificação genética e de verificação de paternidade estão sujeitos a um rigoroso controle de qualidade realizado pela ISAG por meio de testes comparativos internacionais, organizados e coordenados por essa sociedade, permitindo a padronização mundial dos mesmos.

Em 2010, ocorreu o primeiro e único teste comparativo internacional coordenado pela ISAG para a espécie bubalina. Participaram deste teste oito laboratórios, quatro da Europa, um da Ásia, uma da Austrália e dois do Brasil. Porém, somente quatro laboratórios submeteram resultados, sendo um deles o Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, MAPA, em 2004, com intuito de preservar a autenticidade dos registros genealógicos, passou a normatizar para bovinos e equinos o teste de verificação de parentesco regulados internacionalmente pela ISAG. Em 2012, por meio da Instrução Normativa 17 (9/agosto/2012), o MAPA incorporou também, o mesmo controle para bubalinos determinando a execução do teste com 12 marcadores sugeridos pela ISAG. No entanto, a efetividade do conjunto de microssatélites proposto, bem como a validade de tais resultados quando comparados a resultados de outros países ainda não haviam sido analisados.

3. Eficiência de marcadores microssatélites para teste de paternidade

Para a realização do teste de DNA é necessário estudo prévio de um painel de marcadores microssatélites. Estes são co-dominantes, abundantes no genoma, altamente informativos e multialélicos e permitem identificar geneticamente os indivíduos com alto poder de discriminação. Podem ser utilizados para testes de DNA, como os de identificação genética, de paternidade, de caracterização genética, distância genética entre raças e estrutura populacional (Carneiro et al., 2007; Vieira et al., 2011a).

Com auxílio de programas estatísticos são obtidos os valores do número total de alelos (T_a), da diversidade alélica ou frequência alélica (N_a), da riqueza alélica (A_r), da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), do conteúdo de informação polimórfica (PIC), equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) e da probabilidade de exclusão de falso parentesco (PE). Elevados valores de PIC, H_e e PE, apresentam maior eficácia e exatidão em análises de paternidade (Vieira et al., 2011a).

O número total de alelos (T_a) significa o número total de alelos observados em cada marcador microssatélite, em uma população e na população como um todo.

A diversidade alélica (N_a) é definida como o número médio de alelos observados em um *locus* em dada população, sendo este dado imprescindível para o cálculo dos demais parâmetros genéticos. O número médio de alelos é influenciado pelo tamanho amostral, podendo comprometer a comparação entre populações com diferentes tamanhos amostrais. Neste caso a riqueza alélica vem como alternativa (Pires, 2012).

A riqueza alélica (A_r) é o número médio dos alelos encontrados em cada microssatélite, permitindo avaliar a diversidade de alelos por *locus* fixando o tamanho amostral para todas as subpopulações. Esta fixação é a solução para comparação da diversidade de alelos entre as subpopulações, sem que ocorra influência do tamanho da amostra (McManus et al., 2011; Pires, 2012).

A heterozigosidade, tanto a observada quanto a esperada são medidas de variabilidade genética, sendo a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no *locus* marcador e depende do número de alelos e de sua frequência na população. Considera-se um *locus* altamente polimórfico quando o alelo obtiver frequência superior a 0,70 (Pikula E Gronet, 2002; Menezes et al., 2006; McManus et al., 2011).

A heterozigosidade observada (H_o) é a proporção de indivíduos heterozigotos nas amostras da população estudada (McManus *et al.*, 2011).

A medida mais completa de variabilidade genética intrapopulacional é o grau de heterozigosidade esperada (H_e), que pode ser definida como uma fração estimada de todos os indivíduos que poderiam ser heterozigóticos de um loco. É independente de efeitos de

migração, seleção, mutação ou sistema reprodutivo, sendo que este valor permite uma idéia do nível de variação genética de uma população (Nei, 1987; Berg E Hamrick, 1997).

As H_e e a H_o , juntamente com o número médio de alelos, são os parâmetros mais utilizados para se verificar a diversidade genética dentro de uma raça, sendo que a heterozigosidade média de uma população pode ser utilizada para verificar o nível de endocruzamento do rebanho (Egito, 2007).

Quando os valores de H_e e H_o são próximos, diz-se que as populações estão em completo equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Já diferenças significativas entre eles indicam desvios do EHW podendo, a população estar subdividida devido à existência de endogamia significativa ou fluxo de genes de outra população (McManus et al., 2011).

O Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* é um aspecto importante nos estudos de genética da conservação, pois é ele que proporciona a base de referência para se detectar desvios nos acasalamentos ao acaso, ocorrência de seleção, estimar as frequências alélicas em locos que mostram dominância e modelar os efeitos de endogamia e seleção. O equilíbrio é obtido quando se assume que existe uma população fechada (sem migração ou mutação), de tamanho populacional suficientemente grande, acasalamentos aleatórios onde todos os indivíduos têm a mesma chance de se acasarem, podendo ou não acontecer acasalamentos endogâmicos, mas que estariam dentro do acaso, segregação mendeliana com mesma proporção de fertilidade entre os genótipos dos pais e se as frequências alélicas e genotípicas permaneçam constantes de geração a geração (Menezes et al., 2006; McManus et al., 2011).

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) quantifica o valor polimórfico de um microssatélite, tendo total dependência do número de alelos e suas frequências, ou seja, informa o quão polimórfico e a qualidade do microssatélite para estudos genéticos, para testes de identificação de populações e controle de paternidade (McManus et al., 2011). Segundo Botstein et al. (1980), o valor do PIC é pouco informativo quando apresentar valor inferior a 0,25, informação polimórfica moderada se o valor estiver entre 0,25 e 0,5 e se for maior que 0,5, o marcador é altamente informativo.

Quanto maior for o PIC mais eficiente será o marcador microssatélite, sendo preciso observar o grau de indivíduos heterozigotos que pertencem à população estudada. Entretanto, caso haja pouca variabilidade alélica, tem-se elevado nível de homozigotos, que pode ser devido à presença de endogamia no rebanho. Portanto, o PIC possibilita avaliar a confiabilidade da informação obtida em cada marcador microssatélite e, ao utilizá-lo se pode indicar a permanência ou não de um determinado marcador na análise de teste de DNA (Botstein et al., 1980; Pires, 2012).

Os valores de H_e e PIC têm que ser necessariamente semelhantes, pois são diretamente proporcionais. Caso contrário o número amostral e de propriedades avaliadas, a elevada

homozigosidade e a existência de possível consanguinidade podem estar influenciando os valores.

Através dos dados de H_e e PIC, obtém-se a distância genética que permite uma informação mais abrangente, que pode ser obtida das frequências de todos os marcadores microssatélites, ilustrando, assim, a magnitude da diferença genética entre e dentro de populações e, ainda a diferenciação entre raças (Pikula E Gronet, 2002; Vieira et al., 2011a).

Tem-se ainda a probabilidade de exclusão de falso parentesco (PE) que nada mais é que a probabilidade de um determinado indivíduo escolhido aleatoriamente não ser o pai e/ou mãe de um determinado produto (McManus et al., 2011). Este valor é dependente do número de microssatélites, do grau de polimorfismo, do número de animais, da distribuição de frequências dos mesmos na população e do baixo teor de endogamia, sendo utilizado em testes de identificação genética e de paternidade (Rodrigues et al., 2002). De acordo com a ISAG o valor eficaz de PE é o que fornece confiabilidade de 0,9999 ou 99,99%, ou seja, é a probabilidade de 0,0001% de dois indivíduos terem o mesmo genótipo.

Entende-se que para um teste de paternidade ser efetivo o ideal é que seja analisado o trio, ou seja, pai-mãe-filho (Jamieson, 1994), assim, o resultado terá 100% de veracidade, pois será possível determinar com exatidão quais alelos foram herdados tanto do pai quanto da mãe.

Desta forma, utilizando as ferramentas acima descritas, são obtidos dados da identificação genética individual que são necessários aos testes de paternidade e, conseqüentemente da variabilidade genética da população ou da raça, que por sua vez, é fundamental para os programas de melhoramento animal e de conservação genética de rebanhos em situação de risco.

4. Eficácia e exatidão de H_e , PIC e PE em análises de paternidade

Estudos com microssatélites vêm sendo feitos para que se possa cada vez mais aprimorar o teste de paternidade em várias espécies. Paiva et al. (2004) ao testarem a viabilidade do emprego de 18 marcadores microssatélites para testes de exclusão de paternidade em oito raças de ovinos, totalizando 297 animais, concluíram que todos foram polimórficos (variação de seis a 18 alelos, média de 12 por *locus*). A H_e e PIC apresentaram valores mínimos de 0,614 e 0,546, respectivamente, confirmando a polimorfia. O valor médio de PE-2 (0,9999) confirmou a exatidão do teste.

Menezes et al. (2006) verificaram polimorfia nos 27 microssatélites utilizados para a caracterização genética em 332 caprinos (três a 23 alelos por *locus*), bem como

apresentaram alta capacidade para identificar a variabilidade e diversidade genética. Os valores médios de H_e e PIC foram superiores a 0,5 em mais de 70% dos *loci* analisados sendo que estes resultados foram semelhantes a trabalhos relatados por Barker et al. (2001), Yang et al. (1999), Li et al. (2002) e Jandurová et al. (2004). Concluindo que estes microssatélites podem auxiliar em programas de conservação e melhoramento de recursos genéticos.

Carneiro et al. (2007) analisaram 11 marcadores microssatélites em 50 bovinos da raça Nelore, sendo que todos foram altamente polimórficos, com média de 8,2 alelos por loco. Apesar de apresentarem alto grau informativo (valor médio de PIC = 0,647), foi observado déficit de heteroziguidade (observado na divergência dos valores de H_o e H_e , e nas médias de 0,49 e 0,311 respectivamente), causando desequilíbrio de HW devido à existência de endogamia nos rebanhos. Já o valor da PE foi 0,999. Concluíram que o conjunto destes 11 microssatélites mostrou-se eficiente para a determinação de paternidade na raça Nelore, bem como para melhoramento genético da raça.

Franceschi et al. (2006) após analisarem populações de cavalos Crioulos, englobando 371 animais, observaram alto grau de polimorfia, concluindo que a H_e foi mais alta que a H_o , em todos os nove microssatélites estudados, sendo devido à consanguinidade existente na população. Estes resultados encontram-se dentro ou próximos aos relatados por outros autores que trabalharam com cavalos crioulos, Mangalarga Marchador, Quarto de Millha, Lipizzan e Noruegueses. Estudos de Silva Filho et al. (2007) também relataram altos polimorfismos nas seis raças de cavalos estudadas, sendo obtidos elevados níveis de heterozigosidades (média > 0,7) , indicando alta quantidade de variação genética, assim como os valores de PIC (média > 0,55), confirmando os polimorfismos encontrados como altamente informativos. E ao compararem com outros estudos, encontraram resultados semelhantes.

Em búfalos um grande número de microssatélites está sendo caracterizados em todo o mundo (Albuquerque et al., 2006; Rogberg-Muñoz et al., 2010; Vieira et al., 2011, 2011^b e 2012; Marques et al., 2011 - no Brasil, Ángel-Marín et al, 2010 - na Colômbia, Zhang et al., 2007 - na China, Vijn et al., 2008; Muraleedharan et al., 2009 - na Índia, Moioli et al., 2001; Coletta et al., 2010 - na Itália, entre outros). Estes estudos podem vir a auxiliar na seleção dos marcadores para a composição do painel internacional de microssatélites para bubalinos, como ocorreu no teste comparativo coordenado pela ISAG/2010.

Zhang et al. (2007) determinaram a diversidade genética de 933 búfalos de pântano e de rio utilizando 30 microssatélites recomendados pela FAO/ISAG e obtiveram o número médio de 8,13 por loco e a heteroziguidade esperada foi entre 0,51 e 0,61. Estes resultados sugerem uma base para a classificação e conservação dos recursos desses búfalos. Jakhesara et al. (2012) analisaram 10 marcadores microssatélites para testes de paternidade, em búfalos da raça Mehsana, encontrando PIC altamente informativo (> 0,7), H_e com média de 0,762 e PE de 0,993. Valores menores que estes foram encontrados por

Zhang et al. (2007), Ángel-Marín et al.(2010) e Yang et al. (2011), porém também obtiveram elevada polimorfia e heterozigosidades (média PIC e He >0,5), ao analisarem búfalos da China, do Brasil e da Colômbia e da Índia, respectivamente. Rogberg-Muñoz et al. (2010) avaliaram a eficiência de 11 marcadores microssatélites já utilizados em bovinos, em búfalos criados no Brasil, encontrando valores altamente informativos.

Neste sentido, pode-se dizer que quanto mais polimórfico for o marcador microssatélite, maior o conteúdo de informação polimórfica, maior a amplitude alélica e, conseqüentemente, maior a heterozigosidade. Estes dados levam à maior confiabilidade da probabilidade de exclusão de falso parentesco, PE, com valor esperado de 99,99%.

5. Material e Métodos

5.1. Animais e extração de DNA

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de pelos de 590 búfalos criados no Brasil, sendo 514 de Búfalos de Rio, *Bubalus bubalis* var *bubalis* (raças: Jafarabadi, n=58; Mediterrânea, n=185, Murrah, n=190) e 81 de Mestiços e 76 de Búfalos de Pântano, *Bubalus bubalis* var *kerebau* (Carabao). Estas amostras foram enviadas pelos criadores e pela ABCB ao Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, onde os testes foram realizados. Os mestiços foram identificados pelos criadores como produtos de cruzamentos entre búfalos de Rio.

O DNA foi extraído dos pelos utilizando a técnica a da proteinase K (Zabek et al., 2005) utilizada no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG. Após a extração, os microtubos contendo DNA foram armazenados a -20 °C.

Tabela 1: Relação dos búfalos analisados e a localização geográfica

Subespécie	Grupo	n	Cidade	Estado	
Búfalo de Pântano	Carabao n=76	1	Castanhal	PA	
		75	Belém	PA	
Búfalos de Rio	Jafarabadi n=58	36	Jussara	GO	
		1	Nova Andradina	MS	
		21	Tietê	SP	
	Mediterrâneo n=185	1	Castanhal	PA	
		143	Caraguatatuba	SP	
		26	São João da Boa Vista	SP	
	Murrah n=190		3	Castanhal*	PA
			18	Novatimbotêua*	PA
			19	Novatimbotêua*	PA
			6	Castanhal*	PA
75			Natal	RN	
26			Senges	PR	
16			Inhaúma	MG	
14			Cana Verde	MG	
13			Jussara	GO	
Mestiços n=81				58	Pedro Leopoldo
	13	Inhaúma		MG	
	10	Itatiba		SP	
Total		590			

* diferentes propriedades

5.2. Marcadores microssatélites

Foram utilizados 20 marcadores microssatélites recomendados pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG/2010), discriminados na Tabela 2. Os produtos da PCR (pPCR) foram submetidos a corrida eletroforética em sequenciador de DNA automático Modelo ABI 3130 (*Applied Biosystems*) e os resultados analisados pelo programa computacional *GeneMapper v.4.1* (*Applied Biosystems*).

Tabela 2: Relação dos 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG/2010

<i>Primer</i>	<i>Sequência do primer (5'-3')</i>	<i>Referência</i>
BM757	F - TGGAACAATGTAAACCTGGG R - TTGAGCCACCAAGGAACC	Bishop, M.D. et al. A genetic linkage map for cattle
BMS922	F - CCAAATCCAGCCCTTTCTC R - CTCTTAGGGCAACACAACAGC	Stone R.T.et al., 1995; Mamm. Genome 6(10): p.714-724
BM1706	F - ACAGGACGGTTTCTCCTTATG R - CTTGCAGTTTCCCATACAAGG	Slate J et al 1998; Anim. Genet. 29(4), p. 307-315 Kappes et al 1997; Genome Res. 7(3), p. 235-249
BM1824	F - GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC R - CATTCTCCAACGCTTCCTTG	Taylor J.F.et al., 1998; Anim. Genet. 29, p. 228-235
BMC1013	F - AAAAATGATGCCAACCAAATT R - TAGGTAGTGTCCTTATTTCTCTGG	Taylor JF et al 1998, Anim. Genet. 29, p. 194-201
CSSM019	F - TTGTCAGCAACTTCTTGTATCTTT R - TGTTTTAAGCCACCCAATTATTTG	Moore SS et al 1995, Anim Genet. 26(5), p 355-359
CSSM033	F - CACTGTGAATGCATGTGTGTGTGAGC R - CCCATGATAAGAGTGCAGATGACT	Sostengard TS et al. 2001, Anim. Genet. 32(2), p. 112-113
CSSM038	F - TTCATATAAGCAGTTTATAAACGC R - ATAGGATCTGGTAACTTACAGATG	Slate J et al 1998; Anim. Gen 29(4), p. 307-315 Kappes et al 1997; Genome Res. 7(3), p. 235-249
CSSM042	F - GGGAAGGTCCTAACTATGGTTGAG R - ACCCTCACTTCTAACTGCATTGGA	Moore SS et al 1995,Anim Genet. 26(5), p. 355-359
CSSM047	F - TCTCTGTCTCTATCACTATATGGC R - CTGGGCACCTGAAACTATCATCAT	Slate J et al 1998, Anim. Gen 29(4), (p 307-315); Moore SS et al,1995 Anim Genet. 26(5), (p 355-359)
CSSM060	F - AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA R - AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	Taylor JF et al 1997, Anim. Genet. 28(5), p. 360-362 Barendse W. Et al 1994, Nat. Genet. 6, (p 227-235)
CSSM070	F - TTCTAACAGCTGTCACTCAGCC R - ATACAGATTAATACCCACCTG	Moore SS et al 1997; Anim. Genet. 28, (p 376-377)
CYP21	F - GGAGGGTTACAGTCCATGAGTTTG R - TCGCGATCCAACCTCCTCTGAAG	McShane R.D. et al 2001,Anim Genet 32(5), p 235-239
ETH003	F - GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG R - ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	Yang Y.P.et al, 1998; Genomics 48(1), (p 93-99)
FCB304	F - CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG R - CCCTAGGAGCTTCAATAAAGAATCGG	Buchanan,F.C.; Crawford,A.M. Anim. Genet. 24(2):145-145 (1993)
INRA006	F - AGGAATATCTGTATCAACCTCAGTC R - CTGAGCTGGGGTGGGAGCTATAAATA	Slate J et al 1998; Anim. Gen 29(4), (p 307-315)
INRA026	F - TAGTTCCAATGAGACACGAACA R - TAGGAGCACGGAGGTAACAACA	Kappes et al 1997; Genome Res. 7(3), (p 235-249)
MAF65	F - AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG R - CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	Kappes et al 1997; Genome Res. 7(3), (p 235-249)
RM4	F - CAGCAAAATATCAGCAAAACCT R - CCACCTGGGAAGGCCTTTA	Gautier M. et al, 2002, Mamm Genome 13(6), p 316-319 Kappes et al 1997; Genome Res. 7(3), (p 235-249)
TGLA227	F - CGAATTCCAATCTGTTAATTTGCT R - ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	Kappes et al 1997; Genome Res. 7(3), (p 235-249)

5.3. Análise estatística

Para o desenvolvimento do painel de microsatélites para padronização do teste de identificação genética e paternidade bubalina foi avaliada a diversidade genética (riqueza alélica (A_r), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de exclusão de falso parentesco (PE) e equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) para cada grupo individualmente, bem como para a população como um todo. As análises foram realizadas com auxílio dos programas estatísticos Cervus v.3.03 (Marshall et al., 1998) e GenAlex v.6.41 (Peakall E Smouse, 2006). Somente a riqueza alélica foi realizada pelo programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2002).

A A_r avalia a diversidade de alelos por *locus* fixando o tamanho amostral para todas as subpopulações sem que ocorra influência do tamanho da amostra, para este estudo o cálculo foi para 58 indivíduos por subpopulação (menor número de indivíduos referente ao grupo Jafarabadi).

6. Resultados e Discussão

6.1. Desenvolvimento do painel de marcadores microsatélites

Para o desenvolvimento do painel de microsatélites foram analisados 20 marcadores microsatélites, sugeridos pela ISAG/2010, para cada grupo bubalino separadamente e, em seguida para a população como um todo.

Após estas etapas foram desenvolvidos dois painéis de *multiplex*, painel principal e painel auxiliar. Este é utilizado somente em casos onde tenha ocorrido apenas uma discrepância entre o produto e seus supostos progenitores, diminuindo, assim, quaisquer dúvidas sobre a “qualificação” ou “exclusão” de parentesco.

Para a padronização do teste foram observados parâmetros, tais como: o grau de polimorfismo de cada marcador, interação entre marcadores, ausência de picos falsos nas corridas e não sobreposição de picos para minimizar as possibilidades de erros na leitura dos eletroferogramas.

6.2. Análise dos 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG/2010 para cada grupo bubalino

As Tabelas 3 a 7 mostram os dados para os cinco grupos bubalinos criados no Brasil.

Para o grupo Murrah, foram analisados 190 animais, sendo obtidos 176 alelos, com variação de quatro (MAF65) a 24 alelos (ETH3), com valores médios de H_o , H_e e PIC superiores a 0,6, portanto todos os marcadores foram polimórficos. O valor médio de PE foi 0,9999 (Tabela 3). Somente três microssatélites apresentaram desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* (CSSM38, CSSM70 e INRA26).

Tabela 3: Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores microssatélites analisados em 190 búfalos do grupo Murrah

<i>Primer</i>	Ta	Ar	H_o	H_e	PIC	PE-1	PE-2	PE-3	Des-HW
BM757	12	10,402	0,858	0,848	0,827	0,476	0,309	0,338	ns
ETH3	24	17,682	0,747	0,874	0,861	0,399	0,248	0,089	ns
BM1706	8	7,997	0,858	0,856	0,837	0,459	0,295	0,129	ns
CSSM47	14	10,242	0,674	0,708	0,670	0,690	0,510	0,312	ns
INRA 6	13	8,130	0,789	0,854	0,838	0,448	0,286	0,117	ns
BM 922	7	6,496	0,616	0,687	0,642	0,724	0,549	0,361	ns
FCB304	7	6,946	0,811	0,818	0,790	0,542	0,366	0,188	ns
INRA26	7	6,664	0,738	0,824	0,800	0,529	0,529	0,529	***
CSSM19	5	4,917	0,542	0,566	0,476	0,836	0,719	0,577	ns
CSSM70	6	6,685	0,626	0,725	0,677	0,688	0,513	0,330	***
BM1824	7	6,250	0,679	0,712	0,664	0,698	0,525	0,338	ns
CSSM38	12	8,303	0,405	0,767	0,730	0,624	0,445	0,258	***
CSSM42	7	5,987	0,521	0,586	0,558	0,798	0,616	0,413	ns
TGLA227	6	5,512	0,695	0,729	0,682	0,685	0,510	0,328	ns
BMC1013	7	6,268	0,711	0,723	0,672	0,697	0,525	0,346	ns
RM 4	9	6,732	0,374	0,451	0,414	0,893	0,749	0,594	ns
CSSM60	8	6,481	0,653	0,676	0,637	0,729	0,548	0,352	ns
MAF65	4	4,000	0,647	0,670	0,617	0,752	0,582	0,404	ns
CYP21	5	3,967	0,632	0,617	0,548	0,807	0,660	0,505	ns
CSSM33	8	6,680	0,484	0,533	0,499	0,842	0,675	0,490	ns
Média	8,8	7,32	0,653	0,711	0,672	0,9998	0,9999	0,9999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; H_o e H_e : heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; *** $P < 0.001$. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

O grupo Mediterrâneo apresentou um total de 143 alelos, variando de três (CYP21) a 18 alelos (ETH3), com valores médios de H_o , H_e e PIC superiores a 0,6 e $PE=0,9999$ (Tabela 4). Os marcadores microssatélites ETH3, TGLA227, CSSM38, CSSM42 e MAF65 apresentaram desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tabela 4: Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores microssatélites analisados em 185 búfalos do grupo Mediterrâneo

<i>Primer</i>	Ta	Ar	H_o	H_e	PIC	PE-1	PE-2	PE-3	Des-HW
BM757	9	8,058	0,795	0,815	0,788	0,544	0,368	0,189	ns
ETH3	18	13,741	0,632	0,803	0,777	0,552	0,376	0,188	***
BM 1706	9	7,742	0,805	0,802	0,772	0,569	0,391	0,209	ns
CSSM47	10	8,087	0,605	0,684	0,656	0,704	0,516	0,307	ns
INRA6	12	7,520	0,897	0,831	0,807	0,511	0,339	0,163	ns
BM 922	6	5,943	0,784	0,787	0,752	0,601	0,421	0,240	ns
FCB304	7	6,248	0,638	0,596	0,562	0,796	0,618	0,422	ns
INRA26	8	7,234	0,632	0,636	0,567	0,777	0,628	0,457	ns
CSSM19	5	5,000	0,724	0,753	0,710	0,653	0,476	0,293	ns
CSSM70	6	6,833	0,730	0,723	0,669	0,700	0,530	0,354	ns
BM1824	5	4,299	0,746	0,729	0,678	0,696	0,522	0,347	ns
CSSM38	6	5,992	0,476	0,730	0,685	0,679	0,503	0,317	***
CSSM42	5	5,000	0,714	0,745	0,700	0,665	0,488	0,306	***
TGLA227	5	4,342	0,395	0,611	0,538	0,809	0,666	0,511	***
BMC1013	6	5,951	0,578	0,550	0,517	0,829	0,658	0,469	ns
RM 4	7	6,312	0,670	0,713	0,663	0,704	0,532	0,351	ns
CSSM60	5	4,805	0,541	0,583	0,531	0,819	0,661	0,489	ns
MAF 65	5	5,000	0,622	0,754	0,712	0,652	0,474	0,290	***
CYP 21	3	3,000	0,670	0,640	0,561	0,797	0,655	0,507	ns
CSSM33	6	4,940	0,297	0,277	0,265	0,960	0,848	0,731	ns
Média	7,15	6,30	0,648	0,688	0,645	0,9994	0,9999	0,9999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; H_o e H_e : heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; *** $P<0.001$. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

Foram totalizados 113 alelos para os 58 búfalos da raça Jafarabadi, com variação alélica entre três (CSSM38, CYP21 e TGLA227) a 10 (ETH3). Os valores médios de Ho, He e PIC foram superiores a 0,49, enquanto que o da PE foi de 0,9999 (Tabela 5). Os microssatélites FCB304 e CSSM70 apresentaram desequilíbrio de HW.

Tabela 5: Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores microssatélites analisados em 58 búfalos do grupo Jafarabadi

<i>Primer</i>	Ta	Ar	Ho	He	PIC	PE-1	PE-2	PE3	Des-HW
BM757	8	8,000	0,810	0,742	0,701	0,657	0,476	0,281	ns
ETH3	10	10,000	0,534	0,636	0,599	0,762	0,580	0,378	ns
BM 1706	6	6,000	0,621	0,726	0,673	0,691	0,518	0,334	ns
CSSM 47	9	9,000	0,828	0,814	0,781	0,552	0,376	0,194	ns
INRA 6	7	7,000	0,845	0,766	0,732	0,620	0,436	0,240	ns
BM 922	5	5,000	0,621	0,659	0,598	0,765	0,601	0,426	ns
FCB304	6	6,000	0,224	0,781	0,696	0,670	0,496	0,316	***
INRA 26	5	5,000	0,638	0,697	0,633	0,735	0,571	0,399	ns
CSSM 19	4	4,000	0,500	0,436	0,365	0,906	0,802	0,688	ns
CSSM70	6	6,000	0,397	0,771	0,727	0,631	0,453	0,268	***
BM1824	4	4,000	0,448	0,447	0,386	0,901	0,782	0,654	ns
CSSM 38	3	3,000	0,103	0,163	0,155	0,987	0,918	0,849	ns
CSSM 42	6	6,000	0,241	0,309	0,294	0,950	0,828	0,698	ns
TGLA227	3	3,000	0,138	0,330	0,288	0,947	0,847	0,747	ns
BMC1013	5	5,000	0,345	0,360	0,322	0,935	0,820	0,701	ns
RM 4	7	7,000	0,379	0,439	0,418	0,894	0,735	0,558	ns
CSSM 60	5	5,000	0,707	0,722	0,666	0,702	0,530	0,351	ns
MAF 65	5	5,000	0,466	0,536	0,474	0,851	0,711	0,554	ns
CYP 21	3	3,000	0,603	0,634	0,557	0,803	0,657	0,506	ns
CSSM33	6	6,000	0,466	0,486	0,452	0,874	0,716	0,544	ns
Média	5,65	5,65	0496,	0,573	0,526	0,9929	0,9999	0,999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; Ho e He: heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; ***P<0.001. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

No grupo Carabao (n=76) foram encontrados 121 alelos, variando de dois (CSSM60) a 12 alelos (ETH3). Os valores médios de H_o , H_e e PIC foram superiores a 0,5, e o de $PE=0,9999$ (Tabela 6). Três microssatélites apresentaram-se em desequilíbrio de HW (BM757, CSSM42 e ETH3).

Tabela 6: Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores microssatélites analisados em 76 búfalos do grupo Carabao

<i>Primer</i>	Ta	Ar	Ho	He	PIC	PE-1	PE-2	PE-3	Des-HW
BM757	4	3,999	0,224	0,470	0,413	0,888	0,759	0,619	***
ETH3	12	11,119	0,355	0,746	0,702	0,656	0,480	0,291	***
BM1706	8	7,708	0,618	0,576	0,548	0,806	0,624	0,420	ns
CSSM47	7	6,988	0,789	0,793	0,759	0,585	0,405	0,219	ns
INRA6	5	4,708	0,474	0,411	0,374	0,914	0,781	0,639	ns
BM 922	5	5,000	0,737	0,666	0,616	0,747	0,574	0,387	ns
FCB304	7	6,459	0,645	0,635	0,576	0,785	0,624	0,453	ns
INRA26	3	3,000	0,237	0,260	0,242	0,967	0,867	0,766	ns
CSSM19	7	5,975	0,500	0,485	0,460	0,869	0,703	0,519	ns
CSSM70	5	4,526	0,368	0,456	0,420	0,892	0,746	0,589	ns
BM1824	5	5,000	0,579	0,545	0,511	0,835	0,664	0,476	ns
CSSM38	8	7,456	0,408	0,653	0,591	0,766	0,606	0,431	ns
CSSM42	7	6,994	0,408	0,787	0,748	0,604	0,426	0,243	***
TGLA227	7	6,945	0,697	0,660	0,623	0,739	0,557	0,355	ns
BMC1013	6	5,999	0,579	0,665	0,617	0,748	0,574	0,385	ns
RM4	8	7,514	0,711	0,712	0,658	0,704	0,534	0,351	ns
CSSM60	2	1,997	0,053	0,052	0,050	0,999	0,975	0,901	ns
MAF65	6	5,987	0,632	0,575	0,540	0,813	0,637	0,443	ns
CYP21	5	4,987	0,684	0,662	0,594	0,765	0,610	0,441	ns
CSSM33	4	3,988	0,618	0,565	0,468	0,840	0,728	0,593	ns
Média	6,05	5,82	0,516	0,569	0,526	0,9913	0,9999	0,9999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; H_o e H_e : heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; *** $P<0.001$. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

Para o grupo dos 81 Mestiços bubalinos, a variação alélica foi de quatro (CYP21) a 17 (ETH3), totalizando 148 alelos, com médias para Ho, He e PIC superiores a 0,6. O valor médio de PE foi de 0,9999 (Tabela 7) e com desequilíbrio de HW nos *primers* CSSM38 e CSSM70.

Tabela 7: Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores microssatélites analisados no grupo de Mestiços

<i>Locus</i>	Ta	Ar	Ho	He	PIC	PE-1	PE-2	PE-3	Des-HW
BM757	9	8,991	0,827	0,824	0,797	0,524	0,350	0,350	ns
ETH3	17	15,974	0,741	0,861	0,840	0,445	0,285	0,118	ns
BM 1706	8	7,892	0,728	0,824	0,794	0,537	0,362	0,184	ns
CSSM47	11	10,330	0,741	0,818	0,793	0,528	0,353	0,168	ns
INRA6	14	8,913	0,840	0,816	0,791	0,527	0,353	0,166	ns
BM922	6	6,000	0,728	0,707	0,657	0,704	0,530	0,341	ns
FCB304	7	6,892	0,778	0,800	0,763	0,587	0,409	0,230	ns
INRA26	7	6,999	0,753	0,794	0,758	0,588	0,410	0,226	ns
CSSM19	5	5,998	0,691	0,691	0,633	0,730	0,563	0,384	ns
CSSM70	6	5,707	0,531	0,702	0,649	0,714	0,544	0,360	***
BM1824	6	5,892	0,716	0,734	0,679	0,691	0,519	0,343	ns
CSSM38	6	5,885	0,185	0,453	0,412	0,893	0,752	0,599	***
CSSM42	6	5,999	0,617	0,656	0,620	0,744	0,562	0,361	ns
TGLA227	5	5,000	0,667	0,673	0,628	0,737	0,561	0,369	ns
BMC1013	6	5,976	0,691	0,713	0,667	0,699	0,522	0,333	ns
RM4	7	6,415	0,444	0,530	0,501	0,842	0,670	0,479	ns
CSSM60	7	6,892	0,815	0,713	0,669	0,697	0,518	0,327	ns
MAF65	5	5,000	0,593	0,583	0,543	0,811	0,639	0,451	ns
CYP21	4	3,916	0,654	0,590	0,513	0,825	0,688	0,537	ns
CSSM33	6	5,892	0,642	0,602	0,557	0,800	0,630	0,445	ns
Média	7,4	7,03	0,669	0,704	0,663	0,9997	0,9999	0,9999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; Ho e He: heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; ***P<0.001. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

Todos os grupos mostraram altos níveis de heterozigosidade ($>0,50$), com exceção do Jafarabadi ($H_o=0,496$ e $H_e=0,573$) sendo que estes resultados podem estar relacionados ao reduzido número de subpopulações estudadas e, conseqüentemente ao tamanho amostral de cada uma.

Os valores médios do conteúdo de informação polimórfica foram superiores a 0,5, indicando polimorfismo alélico nos 20 marcadores microssatélites analisados por grupo bubalino.

Em adição a estes dados estão os valores das probabilidades de exclusão de falso parentesco, $PE=99,99\%$, confirmando que para um teste de paternidade ser efetivo o ideal é que seja analisado o trio, ou seja, pai-mãe-filho, pois é possível determinar com exatidão quais alelos foram herdados tanto do pai quanto da mãe.

Portanto, estes microssatélites foram eficazes para testes de DNA com a finalidade de identificação genética e teste de paternidade para cada grupo bubalino.

6.3. Análise dos 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG/2010 para a população como um todo

Foram obtidos 219 alelos em toda a amostragem, variando de cinco (CYP21) a 31 (ETH3), sendo a média de 10,95 alelos por microssatélite (Tabela 8). Os mesmos extremos foram observados para a riqueza alélica, variando de 4,461 (CYP21) a 18,769 (ETH3). Todos os marcadores microssatélites apresentaram elevados índices de heterozigosidade ($>0,54$), com exceção de dois, o CSSM38 (0,368) e CSSM33 (0,463) para H_o . Os valores de PIC confirmaram estes altos níveis de heterose com valores superiores a 0,5 apresentando elevado valor de polimorfismo, segundo Botstein et al. (1980). Os dados médios da H_e (0,768) e PIC (0,739) confirmaram o alto grau de polimorfismo. Resultados semelhantes foram encontrados por Kumar et al. (2006), Elbeltagy et al. (2008), Yang et al. (2011) e Kathiravan et al. (2012).

Apesar do elevado polimorfismo, houve desequilíbrio de HW em 15 dos 20 microssatélites analisados, possivelmente pelo reduzido número de rebanhos analisados, seleção de touros e, valores de H_e superiores aos da H_o . Dados semelhantes foram obtidos por Albuquerque et al. (2006) e Marcondes et al. (2011) para búfalos brasileiros e Kumar et al. (2006), Vijh et al. (2008) e Gargani et al. (2009) para búfalos de outros países.

O valor médio da probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais foram testados foi superior a 99,99% ($PE-2=99,99$). Jakhesara et al. (2012) e Kathiravan et al. (2012) obtiveram valores próximos aos deste trabalho, 99,3 e 99,9% respectivamente.

Tabela 8: Relação dos dados da variabilidade genética dos 20 marcadores microssatélites nos 590 búfalos criados no Brasil

<i>Primer</i>	Ta	Ar	Ho	He	PIC	PE-1	PE-2	PE-3	Des-HW
BM757	12	9,988	0,747	0,876	0,863	0,405	0,252	0,097	ns
ETH3	31	18,769	0,639	0,860	0,849	0,416	0,262	0,093	***
BM1706	13	10,460	0,769	0,857	0,840	0,449	0,287	0,122	***
CSSM47	18	13,456	0,692	0,850	0,834	0,454	0,292	0,121	***
INRA6	15	13,433	0,795	0,872	0,859	0,405	0,253	0,093	***
BM922	8	7,967	0,700	0,818	0,795	0,530	0,355	0,173	***
FCB304	11	9,901	0,673	0,815	0,793	0,528	0,353	0,169	***
INRA26	8	7,300	0,632	0,799	0,769	0,574	0,396	0,215	***
CSSM19	9	8,131	0,610	0,788	0,758	0,586	0,407	0,221	ns
CSSM70	7	6,888	0,590	0,789	0,758	0,586	0,408	0,222	ns
BM1824	9	7,955	0,669	0,779	0,747	0,600	0,421	0,233	***
CSSM38	13	9,908	0,368	0,764	0,739	0,603	0,420	0,219	ns
CSSM42	9	8,241	0,553	0,722	0,692	0,664	0,479	0,276	***
TGLA227	8	5,777	0,542	0,733	0,687	0,680	0,505	0,324	***
BMC1013	8	7,387	0,614	0,721	0,680	0,683	0,506	0,316	***
RM4	12	9,072	0,520	0,688	0,666	0,692	0,500	0,284	***
CSSM60	8	6,249	0,568	0,702	0,654	0,712	0,540	0,357	***
MAF65	6	5,267	0,612	0,689	0,651	0,716	0,535	0,341	***
CYP21	5	4,461	0,651	0,672	0,613	0,756	0,594	0,425	ns
CSSM33	9	6,845	0,463	0,562	0,530	0,819	0,645	0,452	***
MÉDIA	10,95	8,873	0,620	0,768	0,739	0,9999	0,9999	0,9999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; Ho e He: heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; ***P<0.001. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

Moioli et al. (2001), ao analisarem búfalos da raça Mediterrânea de três diferentes regiões, obtiveram variação de dois (ILST005) a 19 alelos (ETH3), sendo que encontraram valores próximos aos deste estudo, variando de três alelos (CSSM33), seis (CSSM38), oito (CSSM70), nove (CSSM60), dez (BMC1013), 16 (CSSM47) e 19 (ETH3). Kumar et al. (2006) testaram 27 microssatélites, em oito populações de búfalos indianos de Rio (n=383), obtendo resultados semelhantes, com variação de cinco a nove alelos e com valores de Ho superiores a 0,6, apresentando polimorfismo alélico. Tanto para BM757 quanto para CSSM47 foram obtidos nove alelos, enquanto que neste estudo foram 12 e 18, respectivamente. Elbeltagy et al. (2008) avaliaram 104 búfalos de Rio por meio de 15

marcadores microssatélites, dos quais 13 foram utilizados neste estudo. Encontraram variação alélica de quatro (CSSM38, CSSM70, CYP21) a 11 (CA004), sendo que 10 alelos foram encontrados para INRA26. Os valores médios de H_o e H_e foram superiores a 0,6. Gargani et al. (2009) analisaram 155 búfalos de Rio da Turquia, de seis populações de diferentes regiões, utilizando 21 marcadores microssatélites. Foram identificados 254 alelos, com média de 12,57 por *locus* e H_o , H_e e PIC com valores superiores a 0,5. O mesmo vem ocorrendo com outros trabalhos, como o de Zhang et al. (2011) que ao analisarem 1.208 animais, com 18 marcadores microssatélites, em 34 populações, encontraram variação alélica entre quatro (HMH1R) e 17 (CSRM060). Todos os microssatélites testados foram polimórficos em todas as populações, com exceção de quatro (CSSM38, CSSM045, BRN e HMH1R). A variação dos valores de H_o e H_e foram de 0,367 a 0,617 e 0,353 a 0,614, respectivamente, podendo ter como explicação alto grau de endogamia dentro das populações. Todos estes resultados concordam com os encontrados por Kathiravan et al. (2012) que analisaram 216 búfalos, com 19 microssatélites, cuja variação alélica foi de sete (ILSTS19 e ILSTS25) a 27 (CSSM47), com média de 14,79 por *locus*, com médias superiores a 0,5 para H_o , H_e e PIC.

Os dados aqui apresentados obtiveram médias de H_o , H_e , PIC superiores a 0,6, bem como valores médios de PE foram superiores a 99,99% para a população como um todo quando analisados os três casos de probabilidade de exclusão de falso parentesco. Demonstrando que os 20 marcadores microssatélites utilizados foram altamente informativos indicando, assim, alto índice de confiabilidade e eficácia para testes de identificação genética bubalina.

6.4. Padronização do painel principal de microssatélites para teste de identificação genética e de paternidade

A ISAG recomenda o uso de painéis com pelo menos 12 marcadores microssatélites, com PE média de 0,9999. Assim sendo, procurou-se definir o painel principal usando no mínimo, 12 microssatélites, e que contivesse os principais marcadores utilizados nas rotinas dos laboratórios da Europa, Ásia, América e Oceania que realizam este teste. Dessa forma a emissão de laudos será válida para qualquer laboratório, a nível internacional.

Também foram considerados o número de alelos observados, os valores estimados para H_e e PIC que são relacionados com o grau de polimorfismo de cada marcador, ausência de picos falsos nas corridas e interação entre os marcadores para que não ocorresse a sobreposição de picos a fim de se minimizar a possibilidade de erros na leitura dos eletroferogramas.

Deste modo, marcadores como, por exemplo ETH3 que apresentou maior polimorfismo alélico e um dos maiores PICs nos grupos bubalinos não foi selecionado para compor o painel principal por ter apresentado vários picos falsos em todo seu intervalo alélico.

Considerando o painel principal proposto foram encontrados um total de 125 alelos, apresentando variação de cinco (CYP21) a 18 (CSSM47), com média de 9,62 por microssatélite (Tabela 9). Todos os marcadores microssatélites foram altamente polimórficos, com PIC variando de 0,613 (CYP21) a 0,863 (BM757), obtendo média de 0,724. Em adição a estes dados têm-se os valores médios das heterozigosidades ($H_o=0,642$; $H_e=0,766$). Estes dados confirmam a eficácia dos 13 microssatélites escolhidos para o teste de identificação genética e de paternidade bubalina.

Houve desequilíbrio de HW em 10 microssatélites, possivelmente pelo reduzido número de rebanhos analisados, seleção de touros e, conseqüente deficiência de heterozigosidade. Entretanto, estes dados não influenciaram no polimorfismo detectado e na eficiência do painel.

Tabela 9: Relação dos dados da variabilidade genética do painel principal composto por 13 marcadores microssatélites em búfalos criados no Brasil

<i>Primer</i>	Ta	Ar	Ho	He	PIC	PE-1	PE-2	PE-3	EHW
BM757	12	9,988	0,747	0,876	0,863	0,405	0,252	0,097	ns
BM1706	13	10,460	0,769	0,857	0,840	0,449	0,287	0,122	***
CSSM47	18	13,456	0,692	0,850	0,834	0,454	0,292	0,121	***
BM922	8	7,967	0,700	0,818	0,795	0,530	0,355	0,173	***
INRA26	8	7,300	0,632	0,799	0,769	0,574	0,396	0,215	***
CSSM19	9	8,131	0,610	0,788	0,758	0,586	0,407	0,221	ns
BM1824	9	7,955	0,669	0,779	0,747	0,600	0,421	0,233	***
CSSM42	9	8,241	0,553	0,722	0,692	0,664	0,479	0,276	***
BMC1013	8	7,387	0,614	0,721	0,680	0,683	0,506	0,316	***
RM4	12	9,072	0,520	0,688	0,666	0,692	0,500	0,284	***
CSSM60	8	6,249	0,568	0,702	0,654	0,712	0,540	0,357	***
MAF65	6	5,267	0,612	0,689	0,651	0,716	0,535	0,341	***
CYP21	5	4,461	0,651	0,672	0,613	0,756	0,594	0,425	ns
MÉDIA	9,62	8,148	0,642	0,766	0,736	0,9989	0,9999	0,9999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; Ho e He: heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; *** $P<0.001$.
Programas: Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

O valor médio da probabilidade de exclusão de falso parentesco foi superior a 99,99%. Valor semelhante foi obtido por Coletta et al. (2010) ao analisarem 580 búfalos italianos, raça Mediterrânea, por meio de 13 marcadores microssatélites, dos quais 10 são os mesmos que compõem o painel principal proposto neste estudo.

Ao se comparar os resultados obtidos para os 13 e 20 marcadores microssatélites foram constatados valores com diferenças não significativas entre a H_o e H_e , entre os PICs, bem como entre os valores de PE. Todos os marcadores microssatélites apresentaram alto nível de polimorfismo alélico (Tabela 10).

Tabela 10: Comparação das análises dos painéis com 13 e 20 marcadores microssatélites

Microssatélites	Ar	H_o	H_e	PIC	PE-1	PE-2	PE-3
13*	8,148	0,642	0,766	0,736	0,9989	0,9999	0,9999
20	8,873	0,620	0,768	0,739	0,9999	0,9999	0,9999

* Painel desenvolvido por este estudo

Ar: riqueza alélica; H_o e H_e : heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

Portanto, o painel principal proposto por este trabalho, com 13 marcadores microssatélites, mostrou-se eficiente para o teste de identificação genética e de paternidade em búfalos criados no Brasil. Não havendo, desta forma, a necessidade da utilização de todos os 20 microssatélites.

6.5. Padronização do painel auxiliar para teste de identificação genética e de paternidade

O painel auxiliar foi composto pelos outros sete microssatélites e é necessário, somente em casos onde ocorra apenas uma discrepância entre o produto e seus supostos progenitores, tendo como finalidade diminuir quaisquer dúvidas sobre a “qualificação” ou “exclusão” de parentesco.

Os valores médios de H_o , H_e e PIC foram superiores a 0,5, confirmando elevado polimorfismo alélico (Tabela 11). O valor médio de PE-2 (99,87%), onde ambos os pais são testados, foi próximo ao exigido pela ISAG, 99,99%.

Tabela 11: Relação dos dados da variabilidade genética do painel auxiliar composto por sete marcadores microssatélites nos 590 búfalos criados no Brasil

<i>Primer</i>	Ta	Ar	Ho	He	PIC	PE-1	PE-2	PE-3	Des-HW
ETH3	31	18,769	0,639	0,860	0,849	0,416	0,262	0,093	***
INRA6	15	13,433	0,795	0,872	0,859	0,405	0,253	0,093	***
FCB304	11	9,901	0,673	0,815	0,793	0,528	0,353	0,169	***
CSSM70	7	6,888	0,590	0,789	0,758	0,586	0,408	0,222	ns
CSSM38	13	9,908	0,368	0,764	0,739	0,603	0,420	0,219	ns
TGLA227	8	5,777	0,542	0,733	0,687	0,680	0,505	0,324	***
CSSM33	9	6,845	0,463	0,562	0,530	0,819	0,645	0,452	***
MÉDIA	13,43	10,217	0,582	0,771	0,745	0,9826	0,9987	0,9999	---

Ta: total de alelos; Ar: riqueza alélica; Ho e He: heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; PE-1: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando apenas um dos pais é testado; PE-2: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são testados; PE-3: probabilidade de exclusão de falso parentesco quando ambos os pais são excluídos e Desv-HW: desequilíbrio de *Hardy Weinberg* - ns: não significativa; ***P<0.001. **Programas:** Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

Em vista do proposto por este estudo, o painel principal foi eficaz para testes de identificação genética e de paternidade em búfalos criados no Brasil. E caso haja necessidade, o uso do painel auxiliar deverá ser utilizado.

7. Conclusão

Todos os 20 marcadores microssatélites analisados apresentaram elevado grau de polimorfismo tanto para cada grupo bubalino quanto para a população como um todo.

O painel principal proposto por este estudo com 13 marcadores microssatélites foi eficaz para testes de identificação genética e de paternidade, uma vez que todos os microssatélites foram polimórficos e com confiabilidade de PE=99,99%.

8. Referência Bibliográfica

ABCB (2010) - <http://www.bufalo.com.br/>

ALBUQUERQUE, M.S.M.; EGITO, A.A.; MARQUES, J.R.F. *et al.* Variabilidade genética em búfalos estimada por marcadores RAPD. *Pesq. Agrop. Bras.*, Brasília, v.41, n.4, p.623-628, 2006.

ÁNGEL-MARÍN, P.A.; CARDONA, H.; MORENO-OCHOA, M. *et al.* Analysis of genetic diversity in Colombian buffalo herds. *Rev. Colom. Cienc. Pecu.*, v.23, n4, Medellín, 2010.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of diversity at allozyme loci. *Canadian Jour. Forest Res.*, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.

BARKER, J.S.F.; TAN, S.G.; MOORE, S.S. et al. Genetic variation within and relationship among populations of Asian goats (*Capra hircus*). *Jour. of Anim. Breeding Gene.s*, v.118, p.213-233, 2001.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331, 1980.

CARNEIRO, T.X.; GONÇALVES, E.C.; SCHNEIDER, M.P.C. et al. Diversidade genética e influência de DNA microssatélite para o controle genealógico da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v.59, n.5, p.1257-1262, 2007.

COLETTA, A.; GUBITOSI, L.; LOFFI, C. et al. "DNA microsatellite analysis. An alternative to the mating groups in the buffalo herd." 9TH Buffalo World Congress Buenos Aires Argentina, April. *Rev. Vet.* 21, Sup. 1, 2010.

DOLINSKY, L.C.; PEREIRA, L.M.C.V. DNA Forense – Artigo de Revisão. *Rev. Saúde & Ambiente*, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.11-22, jul-dez, 2007.

EGITO, A.A.; PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M. et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten reole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics*, 8:83, 2007.

ELBELTAGY, A. R.; GALAL, S., ABDELSALAM, A. Z. et al. Biodiversity in Mediterranean buffalo using two microsatellite multiplexes. *Liv. Sci.* 114, pp.341-346, 2008.

FRANCESCHI, R. C.; BRESSEL,R.M.C.; MALONE, E. et al. Distribuição de variabilidade genética por microssatélites na raça de equinos crioulo (*Equus caballus*). 2006.

GARGANI, M.; PARISET, L.; SOYSAL, M.I. et al. Genetic variation and relationships among Turkish water buffalo populations. *Anim. Genet.* – Short Communication, 41, p.93-96, 2009.

GOUDET J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). 2002 - URL: <http://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>

JANDUROVÁ, O.M.; KOOT, T.; IKOTTOVÁ, B. et al. Seven microsatellites markers useful for determining genetic variability in White and Brown Short-Haired goat breeds. *Small Ruminant Research*, 2004.

JAKHESARA, S.J.; RANK, D.N.; KANSARA, J.D. *et al.* Parentage verification in field progeny testing program of Mehsana buffalo (*Bubalus bubalis*). *Published Online First on July 31, 2012.*

JAMIESON, A. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Anim. Genet.*, v.25, supl.1, p.37-44, 1994.

KATHIRAVAN, P.; KATARIA, R.S.; MISHRA, B.P. Power of exclusion of 19 microsatellite markers for parentage testing in river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Mol. Biol. Rep.*, 39:8217–8223, 2012.

KUMAR, S., GUPTA, J., KUMAR, N. *et al.* Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. *Molec. Ecol.*, 15, 593–600, 2006.

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

MACMANUS, C.; PAIVA, S.; CORRÊA, P.S. *et al.* Estatística para descrever Genética de Populações. In.: INCT – Série Técnica: Genética. Disponível em www.animal.unb.br. p.50. 07/01/2011.

MARCONDES, C.R.; MARQUES, J.R.F.; ARAÚJO, C.V. *et al.* Estruturação de dados para avaliação genética de bubalinos em rebanhos – Núcleo Pará: Resultados preliminares. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2011.

MARQUES, J.R.F.; MARTÍNEZ, A.M.; COSTA, M.R. *et al.* Genetic diversity of Brazilian buffaloes (*Bubalus bubalis*) using DNA microsatellites. *Arch. Zootec.*, 60 (232): 1213-1221, 2011.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molec. Ecol.*, 7 (5): 639-655, 1998.

MENEZES, M. P. C.; MARTINEZ, A. M.; RIBEIRO, M. N. *et al.* Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1336-1341, 2006.

MOIOLI, B.; GEORGOUDIS, A.; NAPOLITANO, F. *et al.* Genetic diversity between Italian, Greek and Egyptian buffalo populations. *Liv. Product. Sci.*, 70, pp.203-211, 2001.

MURALEEDHARAN, P.; JAIN, N.; NAIDU, H. *et al.* Development of multiplex reactions for linkage mapping in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Inter. Jour. Integrative Bio.*, 6(3):154-172, 2009.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Gen.*, Austin, v. 87, n. 3, p. 583-590, 1978.

PAIVA, S.R.; FARIA, D.A.; SILVÉRIO, V.C. et al. Viabilidade de *loci* microsatélites para exclusão de paternidade em raças de ovinos. In: *V Simpósio da Soc. Bras. Melhoramento Animal*, Pirassununga, SP, 2004.

PAULIN, L.M.S. & FERREIRA NETO, J.S. Brucelose em Búfalos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.3, p.389-401, 2008.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288–95, 2006.

PIKULA, R.; GRONET, D. Determination of genetic distance between half-breed horse populations relation to their coat colour. *Electronic J. of Polish Agricult, Universities, Animal Husbandry*, v. 5, Issue 1, 2002.

PIRES, D.A.F. Caracterização genética de remanescentes da raça equina nordestina em mesorregiões dos estados da Bahia. Pernambuco e Piauí através de marcadores microsatélites. 2012. 101f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia. Área: Produção Animal.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. In: *Anais do II Simp. Bio. Mol. aplicada à Prod. Anim. Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos*, 2009.

RODRIGUES, S.G.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, C.S. et al. Microsatélites BM2113, ILSTS005, ILSTS008, ETH131 e RM88 em testes de verificação de parentesco para bovinos da raça Gir. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.3, Belo Horizonte, 2002.

ROGBERG-MUÑOZ, A.; TEIXEIRA, L.V.; VEILLEGAS-CASTAGNASSO, E.E. et al. Cross-specific multiplexed microsatellite set for Brazilian buffalo identification. In: *9TH Buffalo World Congress*. Buenos Aires, Argentina, v.21, Sup. 1, 2010. Anais, Buenos Aires: *Revista Veterinaria*, 2010, p.358-361.

SILVA FILHO, E.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.L.C. Variabilidade Genética de Cavalos baseada em DNA Microsatélites. *Ver. Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v.1, n. 1, p. 76, 2007.

VIEIRA, J.N.; TEIXEIRA, C.S.; COELHO, E.G.A.; KUABARA, M.Y et al. DNA microsatellites for genetic identification in Brazilian buffaloes. In: *VI Simposio de Búfalos de las Américas Y Europa*. v.1, p.257-260, 2011.

aVIEIRA, J.N., et al. Importância de teste de DNA para verificação de parentesco em Búfalos (*Bubalus bubalis*). *PUBVET*, Londrina, V. 5, N. 2, Ed. 149, Art. 1004, 2011.

bVIEIRA, J.N.; TEIXEIRA, C.S.; COELHO, E.G.A.; KUABARA, M.Y *et al.* DNA microsatellites for genetic identification in Brazilian Murrah water buffaloes. *Acta Veter.Brasil.*, v.5, n.4, p.364-367, 2011.

cVIEIRA, J.N. et al. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. PUBVET. Londrina. v. 5, n. 2, Ed. 149, Art. 1003. 2011.

VIEIRA, J.N.; TEIXEIRA, C.S.; RODRIGUES, S.G. *et al.* Diversidade Genética de Búfalos de Pântano brasileiros (*Bubalus bubalis* var. *kerebau*), raça Carabao. In: IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012.

VIJH, R.K.; TANTIA, M.S.; MISHRA, B. *et al.* Genetic relationship and diversity analysis of Indian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Sci.*, 86, pp.1495-1502, 2008.

WISCHRAL, A.; GOMES FILHO, M.A. Aplicações da biologia molecular na reprodução molecular. *Rev.Bras.Reprod. Anim. Supl.*, Belo Horizonte, n.6, p.59-63, dez 2009. Disponível em www.cbra.org.br

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

YANG, W.C.; TANG, K.Q.; MEI, J. *et al.* Genetic diversity analysis of an indigenous Chinese buffalo breed and hybrids based on microsatellite data. *Genet. and Mol. Res.*, 2011.

ZĄBEK, T.; RADKO, A.; SŁOTA, E. Implications for the use of horse hair roots as a DNA source for microsatellite typing. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (11): 499–502, 2005.

ZHANG, Y.; SUN, D.; YU, Y.; ZHANG, Y. Genetic diversity and differentiation of Chinese domestic buffalo based on 30 microsatellite markers. *Anim. Genet.*, ISAG, 38:569-575, 2007.

ZHANG, Y.; VANKAN, D.; ZHANG, Y. et al. Genetic differentiation of water (*Bubalus bubalis*) populations in China. Nepal and south-east Asia: inferences on the region of domestication of the swamp buffalo. *Anim. Genet.*, 42, p.569-575, 2011.

CAPÍTULO III – Caracterização genética da estrutura populacional de búfalos criados no Brasil

RESUMO

O conhecimento da variabilidade genética bubalina é essencial para conservação de recursos genéticos e para programas de melhoramento genético, bem como para o estudo da estrutura populacional. Este estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente a estrutura populacional de cinco grupos bubalinos criados no Brasil (Carabao, Mediterrâneo, Mestiços, Murrah e Jafarabadi) por meio de 20 marcadores microssatélites recomendados pela ISAG, com a finalidade de se obter dados da variabilidade e distância genética entre os mesmos. Foram detectados 219 alelos em toda a amostragem, sendo a média de 11,2 alelos por microssatélite. Elevado índice de polimorfismo foi detectado, com valores médios de $He= 0,768$ e $PIC=0,739$. Porém foi observada endogamia ($Fis=0,077$) em toda a amostragem o que pode ser confirmado pelo desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* em 15 microssatélites. No entanto, observou-se que há moderada diferenciação genética entre os grupos bubalinos avaliados ($Fst=0,163$). Tais resultados podem ser devido ao pequeno número de propriedades avaliadas, pela seleção de touros e pela origem dos búfalos. Houve total separação entre búfalos de Rio (*B. bubalis* var. *bubalis*) e de Pântano (*B. bubalis* var. *kerebau*) para $\Delta K=2$. Informações da caracterização genética de bubalinos são necessárias para o maior conhecimento dos grupos existentes no Brasil e, conseqüentemente, para programas de melhoramento genético.

Palavras-chaves: caracterização genética, distância genética, estrutura populacional, búfalos de Rio e de Pântano, Brasil

ABSTRACT

Knowledge of genetic variability buffalo is essential for conservation of genetic resources and breeding programs as well as for the study of population structure. This study aimed to characterize genetically the population structure of five groups established in Brazil buffaloes (Carabao, Crossbred, Mediterranean, Murrah and Jaffarabadi) using 20 microsatellite markers recommended by ISAG , with the aim of obtaining data variability and genetic distance between them. Were detected 219 alleles in all samples, with an average of 10.95 alleles per microsatellite. High level of polymorphism was detected , with average values of $He=0.768$ and $PIC= 0739$. However, it was observed the presence of inbreeding ($Fis=0.077$) in the entire sample can be confirmed by Hardy- Weinberg disequilibrium at 15 microsatellites. However, it was observed that there is a moderate genetic differentiation among buffaloes groups assessed by analyzing the correlation of genes in the population ($Fst = 0.163$). All these results may be due to the small number of evaluated properties, bull selection and the origin of the buffalo. There was a total separation between River (Bubalus bubalis subspecies bubalis) and Whamp buffaloes (B. bubalis subspecies kerebau). The genetic characterization of buffaloes are necessary for better understanding of the existing groups in Brazil and thus for breeding programs .

Key-words: *genetic characterization, genetic distance, population structure, River and Whamp buffaloes, Brazil*

1. Introdução

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) tiveram sua origem na Ásia e os primeiros exemplares foram introduzidos na ilha de Marajó em 1890, dando início à formação do rebanho brasileiro (Santiago, 1960).

A Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) reconhece quatro raças: a Mediterrânea (de origem italiana, dupla-aptidão), a Murrah (de origem indiana, aptidão leiteira) e a Jafarabadi (de origem indiana, dupla-aptidão), denominados Búfalos de Rio (*B. bubalis* var. *bubalis*) e a Carabao (de origem asiática, aptidão para corte e tração), pertencente ao grupo de Búfalos de Pântano (*B. bubalis* var. *kerebau*) (Marcondes et al., 2011; ABCB, 2010). Estas duas variedades de búfalos se diferenciam na morfologia e no comportamento, sendo geneticamente distintos tanto em número de cromossomos (os de Rio com cariótipo $2n=50$ e os de Pântano com $2n=48$) quanto na frequência genotípica de microssatélites (Albuquerque et al., 2006; Zhang et al., 2011). Segundo Zhang et al. (2011), há forte evidência de que tanto os Búfalos de Rio quanto os de Pântano são descendentes do *B. arnee*, sendo que a evidência genética aponta claramente domesticações independentes entre ambas as variedades.

Há cerca de 188 milhões de búfalos no mundo (FAO, 2013), sendo o Brasil o maior centro de criação de búfalos das Américas, com 1.261.922 cabeças, em 2012 (IBGE, 2013) com aumento de 10 a 12% ao ano do rebanho (Embrapa, 2013). Estes números indicam que o quadro nacional da bubalinocultura tende a mudar a médio e longo prazo e que o búfalo é um animal com tendência de crescimento produtivo, devido à crescente procura pela carne, leite e derivados (Vieira et al., 2011). Dessa forma, há necessidade de estudos sobre a estrutura populacional no que refere à distribuição da variabilidade genética e relações genéticas entre e dentro as raças e populações desta espécie. Segundo Kumar *et al.*, 2006; Vijn *et al.*, 2008; Gargani *et al.*, 2009 e Zhang *et al.*, 2011 a diversidade genética de búfalos auxilia na conservação, no desenvolvimento de estratégias para a conservação dos búfalos, na melhoria do ganho genético e em programas de melhoramento genético animal. Estes autores relataram dados de distância genética em búfalos em diferentes regiões no mundo, entretanto, no Brasil, poucos são os trabalhos encontrados na literatura (Albuquerque et al., 2006; Marques et al., 2011).

Marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados para análises genéticas de populações de espécies animais, pois são abundantes no genoma, altamente informativos, multialélicos que permitem identificar geneticamente os indivíduos com alto poder de discriminação (Carneiro et al., 2007). Por isso a necessidade da realização da caracterização genética por meio de marcadores microssatélites com auxílio de programas estatísticos em bubalinos criados no Brasil.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a estrutura populacional de cinco grupos bubalinos criados no Brasil (Carabao, Mediterrâneo, Mestiço, Murrah e Jafarabadi) por meio de 20 marcadores microssatélites recomendados pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG), com a finalidade de se obter dados da distância genética entre os grupos bubalinos.

2. Estrutura populacional

Entende-se por população o conjunto de várias famílias que são compostas por pai, mãe e filhos. Sabe-se que a maioria das populações possui subpopulações, ou seja, há ocorrência da diferença nas frequências alélicas, formando, assim, grupos geneticamente distintos.

A estrutura genética das populações refere-se à distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Esta variação normalmente presente nas populações naturais permite que, ao longo das gerações, sejam criadas infinitas combinações genotípicas. Entretanto, mecanismos micro evolutivos como a seleção natural, deriva genética, mutação, recombinação, fluxo gênico, seleção sexual, migração, dentre outros, podem modificar as frequências de genes e de genótipos (Souza, 2012).

A partir de informações da variabilidade genética (riqueza alélica, heterozigosidade, conteúdo de informação polimórfica e equilíbrio de *Hardy-Weinberg*) é possível estimar os valores das relações filogenéticas entre as populações, ou seja, da estrutura populacional. Para tanto, dados como o conhecimento da localização geográfica e o modo de reprodução também devem ser conhecidos, pois influenciam na distribuição da diversidade genética (Rocha, 2009).

Para análise dos dados obtidos são utilizados programas estatísticos que são ferramentas essenciais na área de genética de populações e de conservação das raças. Esses dados permitem determinar com maior exatidão o nível de diversidade presente dentro e entre populações, diferenciação racial, o grau do fluxo gênico existente entre populações que foram isoladas (ou por fatores naturais ou pela ação do homem), a forma como as populações de uma mesma espécie estão estruturadas ou subdivididas.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) quantifica hierarquicamente a variabilidade genética entre e dentro populações e, ainda, estima os parâmetros na Estatística-F e realiza permutações ao acaso (Peakall et al., 2006).

A Estatística-F também denominada de Índices de Fixação ou Coeficiente de Endogamia (Wright, 1951) é uma forma de medir o grau de diferenciação entre os grupamentos derivados da endogamia na população estudada, analisando, assim, a diminuição da heterozigosidade.

A diferenciação entre as subpopulações está diretamente relacionada ao coeficiente de endogamia dentro e entre populações. A teoria da estatística-F foi proposta por Wright

(1951) para medir os desvios das frequências genóticas em populações subdivididas utilizando três parâmetros: F_{it} , F_{is} e F_{st} , aplicáveis em uma população com nível hierárquico.

O F_{it} indica redução da heterozigosidade de um indivíduo com relação à população como um todo (consanguinidade global). F_{is} é o coeficiente de endogamia do indivíduo na população, indicando a consanguinidade dentro da população (intrapopulacional), ou seja, a redução da heterozigosidade do indivíduo com relação à sua subpopulação, expressando a ocorrência de acasalamentos aleatórios dentro da subpopulação. Os valores de F_{it} e F_{is} quando se apresentam negativos ou próximos de zero, indicam que há variabilidade genética na população (heterozigosidade) e valores distantes de zero (próximos a um) indicam maior número de indivíduos homozigotos, presença de endogamia (Wright, 1951; Nei, 1973; Pires, 2012).

Após leitura de vários artigos, dentre eles Zhang et al. (2011), Gargani et al. (2009), Egito et al. (2007) foi concluído que para interpretação deste trabalho, os valores de F_{is} e F_{it} entre 0,001 a 0,009 indicam presença de variabilidade genética, (heterozigosidade). E valores superiores a 0,010 preconizam que há presença de endogamia na população estudada.

O F_{st} é o coeficiente de endogamia da subpopulação em relação à população total, ou seja, quantifica o grau de divergência entre populações (coancestralidade), onde seu valor é utilizado para medir a distância entre subpopulações, assumindo valores de zero a um (McManus et al., 2011; Albuquerque, 2005). Se a distância genética estiver entre 0,00 a 0,05, indica baixa estrutura genética ou déficit de heterozigosidade ou, ainda, que há alta homozigosidade entre as populações; 0,05 a 0,25, moderada estrutura genética ou diferenciação moderada e maior que 0,25, alta estrutura genética. Quanto maior for esse valor, maior será a diferenciação entre as subpopulações estudadas e maior a variabilidade (McManus et al., 2011).

As análises de distância genética avaliam a variação existente entre grupos relacionados com fatores evolutivos e/ou pela endogamia, estimando o número de substituições gênicas que ocorreram entre elas desde sua divergência a partir de um ancestral comum. Um dos testes utilizado para caracterizar estes dados é o da distância genética de Nei, D_A (Nei's, 1972) que foi desenvolvido para corrigir a dependência do número de alelos com baixa frequência na amostra, fornecendo árvores filogenéticas mais exatas e confiáveis (Pires, 2012).

Com base nas matrizes de distância genética, são construídos dendrogramas pelo método de *Neighbor-Joining* que utiliza pseudoréplicas ou *bootstraps* que possibilitam avaliar a confiabilidade dos erros amostrais sobre as deduções, demonstrando quantas vezes um grupo (*cluster*) foi formado (Weir, 1996; Pires, 2012).

Para complementação da avaliação da estrutura genética, pode se utilizar também o método *Bayesiano* que possibilita a incorporação de informações, tendo como vantagem a ausência de pressuposições quanto aos demais modelos utilizados e a facilidade de estimação por intervalo, denominado de intervalo de credibilidade (Rocha, 2009). Este método desenvolve probabilidades mais informativas e diretas de uma raça estar dentro de outra, devido à formação de *clusters*, verificando a estruturação de uma raça, de uma população por meio do programa Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2012).

Outro parâmetro complementar ao estudo da estrutura genética é a Análise Fatorial de Correspondência (AFC) que é uma variável explicativa através de representação espacial, em 3D, que associa indivíduos à sua provável subpopulação, por meio do Genetix v.4.05 (Belkhir et al., 2004).

Os parâmetros da estatística-F não são afetados pela amostragem: número de alelos por *locus*, número de indivíduos amostrados por população ou número de populações amostradas. Contudo, são dependentes da amostragem genética, ou seja, do tamanho da população e de sua história (Araújo, 2004), por isso o conhecimento da origem da espécie em estudo faz-se necessário.

Portanto, a associação de todos os dados da variabilidade genética obtidos com auxílios de *softwares* estatísticos fornecem a base para a padronização dos testes de DNA (identificação genética e o de paternidade), bem como subsídios para o estudo da estrutura populacional (inter e intra racial ou populacional).

3. Material e Métodos

3.1. Amostras e extração DNA

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de pelos de 590 búfalos criados no Brasil, sendo 514 de Búfalos de Rio, *Bubalus bubalis* var. *bubalis* (raças: Jafarabadi, n=58; Mediterrânea, n=185, Murrah, n=190) e 81 de Mestiços e 76 de Búfalos de Pântano, *Bubalus bubalis* var. *kerebau* (Carabao). Estas foram enviadas tanto pelos criadores quanto pela ABCB ao Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, onde os testes foram realizados. Os mestiços foram identificados pelos criadores como produtos de cruzamentos entre búfalos de Rio.

O DNA foi extraído dos pelos utilizando técnica da proteinase K (Zabek et al., 2005) utilizada no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG. Após a extração, os microtubos contendo DNA foram armazenados a -20 °C.

Tabela 1: Relação dos búfalos analisados e a localização geográfica

Subespécie	Grupo	n	Cidade	Estado	
Búfalo de Pântano	Carabao n=76	1	Castanhal	PA	
		75	Belém	PA	
Búfalos de Rio	Jafarabadi n=58	36	Jussara	GO	
		1	Nova Andradina	MS	
		21	Tietê	SP	
	Mediterrâneo n=185	1	Castanhal	PA	
		143	Caraguatatuba	SP	
		26	São João da Boa Vista	SP	
	Búfalos de Rio	Murrah n=190	3	Castanhal*	PA
			18	Novatimbotêua*	PA
			19	Novatimbotêua*	PA
			6	Castanhal*	PA
			75	Natal	RN
			26	Senges	PR
16			Inhaúma	MG	
14			Cana Verde	MG	
13			Jussara	GO	
Mestiços n=81			58	Pedro Leopoldo	MG
			13	Inhaúma	MG
Total				10	Itatiba
	590				

* diferentes propriedades

3.2. Marcadores Microsatélites

Foram utilizados 20 marcadores microsatélites recomendados pela *International Society for Animal Genetics* (ISAG/2010), sendo eles: BM757, BM922, BM1706, BM1824, BMC1013, CSSM19, CSSM33, CSSM38, CSSM42, CSSM47, CSSM60, CSSM70, CYP21, ETH3, FCB304, INRA6, INRA26, MAF65, RM4 e TGLA227.

3.3. Análise estatística

Para a caracterização genética foi avaliada a variabilidade genética (Ar, Ho, He, PIC e EHW) para a população como um todo bem como para cada grupo individualmente. As análises foram realizadas com auxílio dos programas Cervus v.3.03 (Marshall et al., 1998) e GenAlex v.6.41 (Peakall E Smouse, 2006) e riqueza alélica pelo programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2002), sendo que o tamanho da amostra rarefeita para o cálculo foi de 58 indivíduos por subpopulação.

A estrutura populacional foi analisada por meio da distância genética utilizando o programa GenAlex v.6.41 (Peakall E Smouse, 2006) para o cálculo da AMOVA. Os parâmetros da Estatística-F, Fis, Fit e Fst (Wright, 1951) foram feitos por meio do GenAlex

v.6.41 (Peakall E Smouse, 2006) e pelo TFPGA v.1.3 (Miller, 1997), sendo que este último avaliou pseudoréplicas (*bootstraps*) de 10.000 permutações com intervalo de confiança (IC) de 99%. E ainda, pelo *software* Genetix v.4.05 (Belkhir et al., 2004), estimando o IC em 95% através de 1000 *bootstraps* por *locus* em cada raça e na população como um todo.

Os dendrogramas foram obtidos com auxílio do programa TFPGA v.1.3 (Miller, 1997) avaliando 10.000 pseudoréplicas, com IC de 99%, baseados na distância genética de Nei's (1972), D_A .

Em complementação ao estudo da estrutura genética foram utilizados a AFC por meio do programa Genetix v.4.05 (Belkhir et al., 2004) e o método *Bayesiano* com o uso do *software* Structure v.2.3.4 (Pritchard et al., 2012) segundo o protocolo utilizado por Zhang et al. (2011).

4. Resultados e Discussão

4.1. Variabilidade genética

Foram obtidos 219 alelos em toda a amostragem, variando de cinco (CYP21) a 31 (ETH3), sendo a média de 10.95 alelos por microssatélite (Tabela 2). Os mesmos extremos foram observados para a riqueza alélica, variando de 4,461 (CYP21) a 18,769 (ETH3). Os valores médios de H_o , H_e e PIC foram superiores a 0,6 indicando elevado grau de polimorfismo. Resultados semelhantes foram encontrados por Kumar et al. (2006), Elbeltagy et al. (2008), Yang et al. (2011) e Kathiravan et al. (2012).

No entanto, ao analisar o índice de endogamia da subpopulação em relação à população total F_{st} , observou-se, segundo Wright (1951), Raymonds et al. (1995) e McManus et al. (2011), que os búfalos testados possuem estrutura genética intermediária ($F_{st}=0,163$), ou seja, indica que há moderada diferenciação genética entre os grupos bubalinos avaliados. Tal similaridade pode ser devido ao fato de Mestiços terem sido testados neste estudo, ou ainda, à possível utilização de reduzido número de reprodutores. E, segundo Santiago (1960), devido ao considerável número de animais cruzados que a maioria dos criadores dispunha em meados de 1920, e, ainda, da forte evidência de terem o mesmo ancestral comum *B. arnee* (Zhang et al., 2011).

Tabela 2: Parâmetros genéticos dos 20 marcadores microssatélites nos 590 búfalos criados no Brasil

<i>Primer</i>	Ta	Ar	Ho	He	PIC	EHW	Fis	Fit	Fst
BM757	12	9,988	0,747	0,876	0,863	ns	0,045	0,189	0,150
ETH3	31	18,769	0,639	0,860	0,849	***	0,035	0,149	0,118
BM1706	13	10,460	0,769	0,857	0,840	***	0,001	0,151	0,150
CSSM47	18	13,456	0,692	0,850	0,834	***	0,030	0,190	0,164
INRA6	15	13,433	0,795	0,872	0,859	***	-0,014	0,240	0,250
BM922	8	7,967	0,700	0,818	0,795	***	0,184	0,305	0,148
FCB304	11	9,901	0,673	0,815	0,793	***	0,042	0,163	0,127
INRA26	8	7,300	0,632	0,799	0,769	***	-0,013	0,221	0,231
CSSM19	9	8,131	0,610	0,788	0,758	ns	-0,038	0,057	0,091
CSSM70	7	6,888	0,590	0,789	0,758	ns	0,062	0,243	0,193
BM1824	9	7,955	0,669	0,779	0,747	***	0,046	0,090	0,046
CSSM38	13	9,908	0,368	0,764	0,739	ns	0,089	0,267	0,196
CSSM42	9	8,241	0,553	0,722	0,692	***	-0,005	0,185	0,189
TGLA227	8	5,777	0,542	0,733	0,687	***	-0,024	0,199	0,217
BMC1013	8	7,387	0,614	0,721	0,680	***	0,228	0,289	0,080
RM4	12	9,072	0,520	0,688	0,666	***	0,135	0,262	0,147
CSSM60	8	6,249	0,568	0,702	0,654	***	0,133	0,309	0,203
MAF65	6	5,267	0,612	0,689	0,651	***	-0,051	0,106	0,149
CYP21	5	4,461	0,651	0,672	0,613	ns	0,211	0,340	0,164
CSSM33	9	6,845	0,463	0,562	0,530	***	0,427	0,563	0,238
MÉDIA	10,95	8,873	0,620	0,768	0,739	---	0,077	0,226	0,163

Ta: número de alelos; Ho e He: heterosigozidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; EHW: significância do Equilíbrio de *Hardy Weinber* – ns: não significativa; ***P<0.001 e Estatística-F: Fis: índice de engogamia do indivíduo na subpopulação, Fit: consanguinidade do indivíduo na população total e Fst: índice de coancestralidade **Programas:** Cervus v.3.0.3; GenAlEx v.6.41

Kumar et al. (2006), Vijh et al. (2008) e Gargani et al. (2009) embora tenham encontrado altos valores da variabilidade alélica e do PIC, concluíram que as populações de búfalos de Rio estudadas encontravam-se em desequilíbrio de HW. Isso devido ao pequeno número amostral, à deficiência de heterozigotos, aos diferentes valores obtidos nas heterozigosidades, levando ao aumento da endogamia (Fis). O mesmo não ocorreu na pesquisa de Zhang et al. (2011), ao analisarem búfalos de Rio e de Pântano, pois os valores de Ho e He não foram significativamente diferentes entre as populações, obtendo-se médias aproximadas de 0,5, indicando heterozigosidade significativa. Entretanto, ao analisarem os valores médios de Fst, estes mesmos autores, concluíram que, apesar de serem grupos distintos, as populações estudadas possuíam baixa variabilidade genética

quando analisados dentro das populações de rio e de pântano (0,049 e 0,060, respectivamente).

A Tabela 3 mostra os valores da variabilidade genética de cada grupo bubalino. Os valores médios da riqueza alélica (Ar), que avalia a diversidade de número de alelos por microssatélite fixando o tamanho amostral ($n=58$) para todas as subpopulações variou de 5,65 (Jafarabadi) a 7,32 (Murrah). Estes dados podem ser devido ao número de diferentes propriedades por grupo bubalino, três para Jafarabadi e nove propriedades para Murrah e possível controle de acasalamentos. Estes resultados também podem ser explicados pelas estimativas dos valores de He e PIC ($>0,5$) que evidenciam elevado grau polimórfico, bem como pequeno número de microssatélites com desvio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 3). Houve desvio do EHW de dois microssatélites para o grupo de Mestiços (CSSM38 e CSSM70) e para Jafarabadi (FCB304 e CSSM70) a cinco para o grupo Mediterrâneo (CSSM38, CSSM42, ETH3, TGLA227 e MAF65).

Tabela 3: Parâmetros genéticos por grupo bubalino criado no Brasil

Grupo	Ta	Ar	Ho	He	PIC	Fis	Des-HW
Murrah	176	7,32	0,653	0,709	0,672	0,080	3
Mestiço	148	7,03	0,669	0,704	0,663	0,052	2
Mediterrâneo	143	6,30	0,648	0,688	0,645	0,052	5
Jafarabadi	113	5,65	0,496	0,573	0,526	0,135	2
Carabao	121	5,82	0,516	0,567	0,526	0,073	3
Média	10,95	8,873	0,620	0,768	0,739	0,077	---

Ta: total de alelos; Na: número médio de diferentes alelos; Ar: riqueza alélica; Ho e He: heterosigoidades observada e esperada, PIC: conteúdo de informação polimórfica; F- Fis: índice de endogamia do indivíduo na subpopulação e Desv-HW: número de microssatélites em desequilíbrio de *Hardy Weinberg*.
Programas: Cervus v.3.0.3; Genalex v.6.41; FStat v.2.9.3.2

O índice de endogamia, Fis, variou de 0,052 (Mestiços e Mediterrâneo) a 0,135 (Jafarabadi), caracterizando deficiência de heterozigotos, portanto, predomínio de endogamia nas populações analisadas (Tabela 3). A presença da endogamia nas populações estudadas pode ser em função do reduzido número de rebanhos analisados, ao tipo de manejo reprodutivo utilizado, à seleção de touros e valores de He superiores aos de Ho e, consequentemente, $Fis > 0$.

A Tabela 4 mostra a evidência da existência de alelos privados e respectivas frequências destes por raça bubalina criada no Brasil para as análises realizadas até o momento. No entanto, à medida que novos animais forem testados estes dados podem ser alterados, tanto no surgimento de novos alelos privados por grupo quanto que alelos já determinados específicos podem deixar de sê-los.

Alelos privados estão associados à determinação da especificidade de cada grupo, raça, ou seja, são representativos de determinado grupo. Além da possibilidade de estarem coligados a algum tipo de produção, como leite, carne, porcentagem de gordura no leite, maciez da carne, precocidade. Entretanto, até o momento, nenhum relato foi encontrado sobre qualquer tipo de correlação.

Em Mestiços não foram observados alelos privados devido a este grupo ser o resultado de cruzamentos entre indivíduos das raças de búfalos de Rio.

Tabela 4: Relação da frequência dos alelos privados por grupo de búfalos do Brasil

MEDITERRÂNEO						
ETH3	BM1824	CSSM47	INRA26			
122 (0,003)	194 (0,003)	135 (0,043)	100 (0,014)			
140 (0,016)						
146 (0,005)						
174 (0,008)						
MURRAH						
ETH3	CSSM47	CSSM38	BM757	CSSM33	RM4	FCB304
96 (0,005)	151 (0,003)	165 (0,013)	177 (0,008)	160 (0,003)	163 (0,005)	153 (0,021)
106 (0,005)	155 (0,003)	167 (0,003)	185 (0,016)			
124 (0,003)	163 (0,011)					
134 (0,005)						
TGLA227	CSSM60					
82 (0,005)	118 (0,005)					
JAFARABADI						
CSSM33	CSSM47					
158 (0,026)	157 (0,017)					
CARABAO						
CSSM19	BM1706	TGLA227	CSSM42	RM4	FCB304	BM1824
137 (0,704)	161 (0,007)	88 (0,033)	202 (0,033)	131 (0,355)	139 (0,526)	180 (0,651)
153 (0,020)	233 (0,632)	90 (0,013)	208 (0,132)	139 (0,046)	155 (0,211)	
159 (0,105)	261 (0,092)					
161 (0,026)						
MAF65	CSSM38	CSSM70	ETH3	BMC1013	BM922	
113 (0,020)	169 (0,007)	121 (0,138)	168 (0,026)	249 (0,039)	60 (0,243)	

Programa: GenALEx v.6.41

A Tabela 5 apresenta a relação dos microssatélites e seus respectivos alelos às duas variedades bubalinas, a de Pântano e a de Rio, sendo que os mestiços foram incluídos aos de Rio, devido às informações obtidas com os criadores e com a ABCB, onde foram obtidas as amostras. Os alelos com marcações são específicos para cada variedade de búfalos.

Embora todos os microssatélites utilizados sejam de sequências de dinucleotídeos, ou seja, com repetições de dois pares de bases (pb), o marcador INRA6 apresentou fragmentos de tamanhos ímpares em toda sua extensão nos cinco grupos bubalinos analisados (Tabela 5). Entretanto, nenhum relato foi encontrado na literatura até o momento.

4.2. Distância genética entre os grupos bubalinos

A Tabela 6 mostra as estimativas de F_{st} , índice de endogamia da subpopulação em relação à população total, entre pares dos grupos estudados. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Albuquerque (2005) e Marques et al. (2011), onde búfalos de Rio e de Pântano são geneticamente distintos.

Já para a distância genética entre os grupos bubalinos, Albuquerque (2005), encontrou resultados distintos. Este autor observou que a maior distância genética estava entre os grupos Mediterrâneo e Carabao ($F_{st}=1,886$) enquanto que neste estudo, Jafarabadi e Carabao apresentaram maior divergência ($F_{st}=1,482$). Já Marques et al. (2011) encontraram dados semelhantes aos aqui mostrados, também avaliando búfalos brasileiros, obtendo o maior valor de F_{st} entre Jafarabadi e Carabao ($F_{st}=0,944$).

Estes resultados podem estar associados com a localização geográfica das populações analisadas, número e quais de marcadores microssatélites foram utilizados para cada trabalho individualmente.

Tabela 6: Distância (abaixo da diagonal) e similaridade (acima da diagonal) genética entre os grupos bubalinos do rebanho brasileiro, segundo Nei's (1972/1978 e 1983)

Mediterrâneo	Murrah	Jafarabadi	Carabao	Mestiço	
---	0,737	0,721	0,249	0,801	Mediterrâneo
0,305	---	0,791	0,298	0,912	Murrah
0,327	0,234	---	0,227	0,854	Jafarabadi
1,392	1,212	1,482	---	0,285	Carabao
0,222	0,092	0,158	1,255	---	Mestiço

Programa: TFGPA v.1.3 (Nei's, 1972/1978) e GenAlEx v.6.41 (Nei's, 1983)

Ao comparar a similaridade genética entre as quatro raças reconhecidas pela ABCB com Mestiços, observou-se que Murrah e Mestiços foram as que mais se assemelharam (91,2%) e as que menos, Carabao e Mestiços (28,5%).

Mas ao analisar somente os grupos considerados puros, pode-se notar que a maior semelhança foi de 79,1% entre Jafarabadi e Murrah (Tabela 6), o mesmo ocorrendo nos estudos de Vigh et al. (2008) e Marques et al. (2011). Segundo Santiago (1960), houve, em 1918, 1920 e 1947, importações de animais com predominância de sangue tanto de Jafarabadi quanto de Murrah e que possíveis cruzamentos entre essas raças foram realizados. Isso leva a crer que houve compartilhamento e disseminação alélica de geração para geração. Outro dado importante é a origem de ambas as raças, origem indiana (Marcondes et al., 2011; ABCB, 2010). Entretanto, Albuquerque (2005), observou maior proximidade genética entre Murrah e Mediterrâneo. Estes dados podem estar relacionados

ao número de animais testados, número de propriedades e localização geográfica para cada estudo desenvolvido.

Para complementar estes dados foi realizado teste da Análise Fatorial de Correspondência, que detectou a formação de dois grupos totalmente distintos, visualizados em 3D (Figura 1). Sendo um representado por Búfalos de Pântano, formado pelo grupo Carabao (*B. bubalis* var. *kerebau*), de cor cinza, e outro por Búfalos de Rio (*B. bubalis* var. *bubalis*): grupo Mediterrâneo (amarelo), Murrah (azul), Jafarabadi (branca) e grupo de Mestiços (rosa). Os resultados obtidos demonstraram que entre os Mestiços há maior predominância das raças Murrah e Jafarabadi, sendo estes resultados confirmados na Tabela 6, onde a similaridade genética é de 91,2 e 79,1%. Isto pode ser devido à presença de cruzamentos entre estas raças na população estudada.

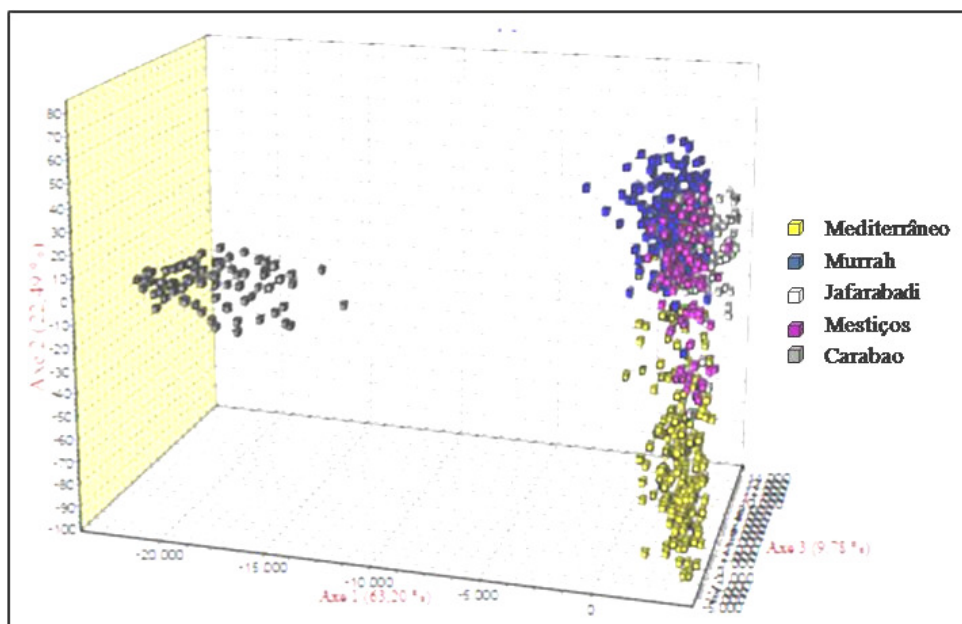


Figura 1: Representação espacial da relação dos indivíduos por subpopulação baseada nos resultados da Análise Fatorial de Correspondência. **Programa:** Genetix v.4.05

A Figura 2 representa o dendrograma de distância genética, D_A (Nei's, 1972), usando o Método de *Neighbor*. Os resultados estão de acordo com *bootstrapping* de 10.000 permutações. Também foi observada total separação entre Búfalos de Pântano e de Rio, maior similaridade genética entre Murrah e Mestiços e que Jafarabadi está mais próximo de Murrah e Mestiços, indicando que houve maior troca alélica entre elas. Já o Mediterrâneo está mais distante, comprovando o demonstrado na Tabela 6 e Figura 1.

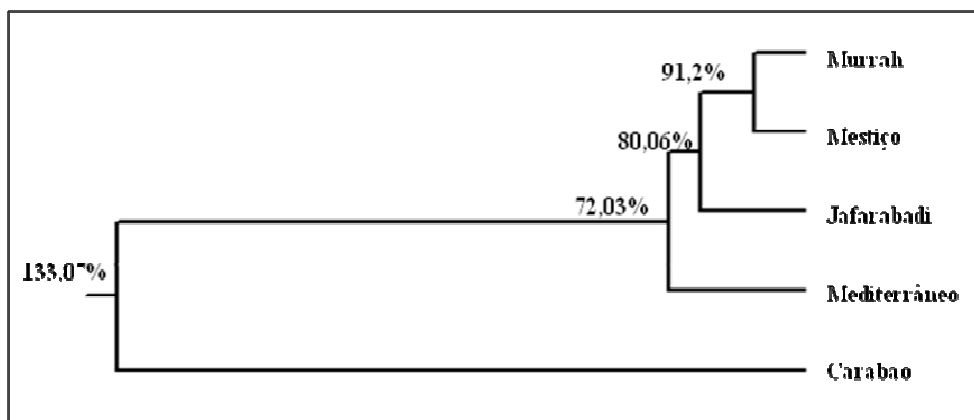


Figura 2: Dendrograma caracterizando total separação entre búfalos de Pântano (Carabao) e de Rio (Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Mestiços), construído baseado na distância genética D_A (Nei's, 1972). Os valores de reamostragem genética estão presentes no dendrograma. **Programa:** TFPGA v. 1.3

A AMOVA dos cinco grupos bubalinos brasileiros baseados nos dados dos 20 marcadores microssatélites, estimou que 26% e 74% das variabilidades genéticas estão entre e dentro das populações estudadas (Figura 3). Confirmando, assim, que há maior variabilidade dentro das populações, ou seja, entre os indivíduos. Resultado semelhante foi encontrado por Albuquerque (2005), 12,27% e 87,73%, respectivamente em búfalos brasileiros.

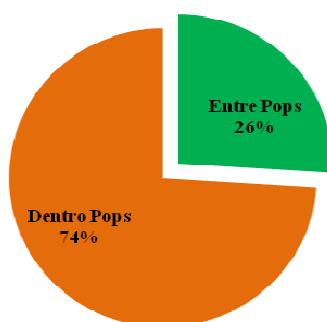


Figura 3: Porcentagem da variância molecular obtidos pela AMOVA entre os cinco grupos bubalinos. **Programa:** GenAlEx v.6.41

Ao se analisar os cinco grupos como um todo por meio do método *Bayesiano*, que fornece dados da pureza de cada indivíduo analisado bem como do grupo (Structure v.2.3.4), foram obtidos três valores de ΔK (2, 3 e 5), onde k é o número de grupos formados. O $\Delta K=2$ está relacionado às duas subespécies bubalinas (búfalos de Rio e de Pântano). O $\Delta K=3$ considera a origem das raças (italiana, indiana e asiática) e o $\Delta K=5$ indica a análise dos cinco grupos estudados (Figura 4).

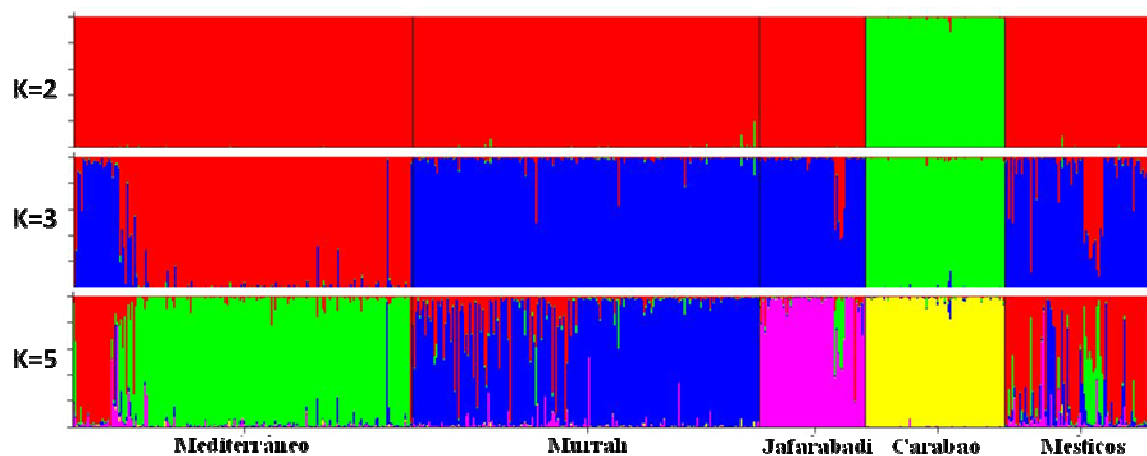


Figura 4: Análise da estrutura dos grupos bubalinos por meio do método *Bayesiano*. K é o número de grupos formados ($K=2, 3$ e 5). As cores representam os *clusters* que são os grupos bubalinos estabelecidos. **Programa:** Structure v.2.3.4

O K mais significativo estabelecido pelo programa foi o $\Delta K=2$, indicando que houve separação completa entre búfalos de Rio e de Pântano (Figura 4). Neste caso não foram observados padrões raciais para os grupos pertencentes à variação búfalos de Rio. Este resultado confirma o obtido pela Análise de Correspondência Fatorial (Figura 1), Fst (Tabela 6) e pelo dendrograma (Figura 2), bem como o encontrado por Albuquerque (2005), Zhang et al. (2007), Marques et al. (2011) e Zhang et al. (2011).

A Tabela 7 demonstra a proporção de indivíduos em cada grupo para a formação dos dois grupos distintos para $\Delta K=2$. Estes dados indicam o quão, em porcentagem, os indivíduos são puros, ou seja, possuem caracterização genética de determinada raça. O *cluster* 1 representa os búfalos de Rio onde 99,8% dos indivíduos das raças Mediterrânea e Jafarabadi, 99,7% dos Mestiços e 99,5% dos de Murrah possuem caracterização genética de búfalos de Rio. Somente 0,2-0,3 e 0,5% dos animais possuem algum tipo de influência genética dos búfalos de Pântano. O mesmo ocorrendo com os búfalos de Pântano, representados pelo *cluster* 2, onde 99,4% dos indivíduos da raça Carabao são puros enquanto que, apenas, 0,6% sofreram influência alélica dos búfalos de Rio. Estes dados podem ser visualizados na Figura 4, cujas cores são vermelha para o *cluster* 1 (búfalos de Rio) e verde, para o *cluster* 2 (búfalos de Pântano). Quando a cor verde aparece no *cluster*

1, indica que os búfalos de Rio sofreram influência genética das dos búfalos de Pântano e vice-versa. Pode-se concluir que mais de 99,5% dos búfalos avaliados pertenceram a uma das duas variedades *B. bubalis* var. *bubalis* ou *B. bubalis* var. *kerebau*. Esta inferência pode ser devido a cruzamentos realizados em meados do século XX (Santiago, 1960 e Marques et al., 2011), como também por possivelmente terem o mesmo ancestral comum, o búfalo selvagem Arnee (Zhang et al., 2011). Entretanto, ao realizar análise estatística, percebeu-se que não há diferença significativa entre estes valores.

Tabela 7: Proporção de indivíduos em cada grupo para $\Delta K=2$

Grupo	Clusters estimados (%)		n
	1 (vermelho)	2 (verde)	
Mediterrâneo	99,8	0,2	185
Murrah	99,5	0,5	190
Jafarabadi	99,8	0,2	58
Carabao	0,6	99,4	76
Mestiço	99,7	0,3	81

Programa: Structure v.2.3.4

Para o $\Delta K=3$, houve separação entre os grupos dos búfalos de Rio, onde o grupo de Mediterrâneo diferenciou-se dos Murrah, Jafarabadi e Mestiços, bem como do de Carabao (búfalos de Pântano). Estes resultados podem ser explicados pelas origens dos grupos: Mediterrâneo (origem italiana), Murrah e Jafarabadi (origem indiana), Carabao (sudeste asiático) e o grupo de Mestiços (maior predomínio de cruzamentos entre animais das raças Murrah e Jafarabadi). Estes dados diferem dos de Marques et al. (2011) que ao analisarem 200 búfalos de Rio e de Pântano criados no Brasil com 25 marcadores microssatélites relataram que as raças Mediterrânea e Murrah agruparam-se em um mesmo *cluster*, demonstrando alta similaridade genética entre elas. Esta diferença pode estar associada ao menor número de animais analisados e por terem utilizados 25 marcadores, dentre os quais somente seis são semelhantes aos deste trabalho, ou seja, 18 microssatélites foram diferentes. A Tabela 8 demonstra a proporção de indivíduos em cada grupo para a formação dos três grupos distintos para $K=3$.

Tabela 8: Proporção de indivíduos em cada grupo para $\Delta K=3$

Grupo	Clusters estimados (%)			n
	1 (vermelho)	2 (azul)	3 (verde)	
Mediterrâneo	83,7	15,9	0,4	185
Murrah	1,5	98,0	0,4	190
Jafarabadi	5,8	94,0	0,2	58
Carabao	0,6	0,6	98,8	76
Mestiços	15,7	83,9	0,4	81

Programa: Structure v.2.3.4

Ao analisar K em relação ao número de raças testadas ($\Delta K=5$) foram observadas composições heterogêneas das mesmas.

Ao analisar cada *cluster* percebeu-se que o *cluster* 4 (amarelo), grupo Carabao foi o mais puro (97,8%), ou seja, que compartilha menos alelos com os demais grupos por apresentarem proporções estatísticas não significativas (0,4% do grupo Mediterrâneo, 0,3% do Murrah, 0,2% do Jafarabadi e 0,3% dos Mestiços). Isto pode ser explicado por estes animais estarem localizados na região norte do Brasil, onde não sofrem cruzamentos com os demais grupos bubalinos.

O *cluster* 1 (verde) é representado pelo grupo Mediterrâneo (80,3%), onde há animais com presença alélica crescente de Carabao (0,6%), Murrah (1,6%), Jafarabadi (4,9%) e Mestiços (10,7%). Explicações para os demais *clusters* são semelhantes a esta. Portanto, a Análise *Bayesiana* identificou as quatro raças bubalinas reconhecidas pela ABCB com precisão superior a 80 % para $\Delta K=5$.

Tabela 9: Proporção de indivíduos em cada grupo para $\Delta K=5$

Grupo	Clusters estimados (%)					n
	1 (verde)	2 (azul)	3 (rosa)	4 (amarelo)	5 (vermelho)	
Mediterrâneo	80,3	2,2	2,7	0,4	14,4	185
Murrah	1,6	83,9	2,5	0,3	11,6	190
Jafarabadi	4,9	1,2	90,0	0,2	3,7	58
Carabao	0,6	0,7	0,4	97,8	0,5	76
Mestiços	10,7	16,6	5,9	0,3	66,4	81

Programa: Structure v.2.3.4

Marques et al. (2011) relataram que alguns indivíduos da raça Murrah, introduzidos no Brasil no século XX, sofreram cruzamentos com os Mediterrâneos para seleção do fenótipo da raça Murrah, desenvolvendo a raça Murrah brasileira atual. Esta seleção artificial ocasionou uma divisão interna com indivíduos com origens ancestrais distintas que poderiam afetar o futuro da preservação da raça. A raça Jafarabadi também apresentou composição genética heterogênea. Estes dados são confirmados por Santiago (2000) e Marcondes et al. (2011), que divulgaram que criadores marajoaras realizaram cruzamentos entre búfalos de Rio com Carabao e entre Murrah e Jafarabadi, disseminando, assim, alelos em comum entre as raças. E ao observar as Figuras 2, 3 e 4 deste trabalho, pode-se concluir que os cruzamentos entre búfalos de Rio e de Pântano foram diminuindo até chegar ao ponto da possibilidade da total separação entre estas subespécies.

Com o passar dos anos, reprodutores e matrizes foram selecionados, possivelmente sem a devida preocupação com acasalamentos e cruzamentos endogâmicos, acarretando, no rebanho nacional, índices de consanguinidade ($Fis=0,077$), Tabela 2. Dessa maneira, faz-se necessária a introdução de diferentes materiais genéticos nos rebanhos para que se possa aumentar a variabilidade genética dos mesmos. Reforçando, assim, a importância do uso marcadores microssatélites para auxiliar programas de conservação de recursos genéticos para os búfalos criados no Brasil.

Além deste relato histórico para possíveis explicações sobre as composições heterogêneas dos grupos bubalinos, há também a classificação das raças para fins de Registro Genealógico (RG) da ABCB, aprovado pelo MAPA.

É previsto pelo regulamento do Serviço de Registro Genealógico (SRG) da ABCB o registro de animais na categoria animais puros de origem (PO), animais puros por cruzamento de origem conhecida (PCOC), animais puros por cruzamento de origem desconhecida (PCOD), animais de livro aberto (LA) os quais são animais de ambos os sexos pertencentes a rebanhos fechados de raça exclusiva. Como também, fêmeas mestiças (FM) compreende búfalas mestiças, inclusive as descornadas, que podem servir como base a cruzamentos absorventes para uma das raças bubalinas. No regulamento vigente lê-se:

“Art. 26- Serão registrados como animais Puros de Origem (PO) os produtos originários de animais Puros de Origem, nascidos ou não no Brasil, portadores de documentos que assegurem a sua origem, bem como os que atinjam número de 4 (quatro) gerações para a raça contadas a partir do primeiro animal registrado como LA, PCOC ou PCOD, sempre cruzado com outro animal de grau de sangue superior e submetidos a inspeção zootécnica por Comissão de Julgamento ou Jurado Único do Serviço de Registro Genealógico da raça, atendidas as normas aprovadas pelo Ministério da Agricultura.”

Neste mesmo regulamento (Art. 17) é exigido do criador a escrituração zootécnica dos animais:

“Art. 17- O criador obriga-se à manutenção do livro de escrituração zootécnica ou fichas individuais de identificação dos animais, bem como das cópias dos comunicados de ocorrências, remetidas ao SRG da ABCB.”

Este regulamento é, até então, a ferramenta que orienta a comprovação dos cruzamentos raciais de bubalinos tanto para a ABCB quanto para o MAPA. Como também, para a explicação da Análise *Bayesiana* ($\Delta K=5$) sendo observados compartilhamentos alélicos entre os indivíduos e grupos analisados neste estudo, cuja sensibilidade das técnicas utilizadas é significativamente mais precisa para detecção de genes relacionados a determinados grupos do que manifestações fenotípicas de cada indivíduo.

5. Conclusão

A estrutura genética dos búfalos testados foi moderada, indicando que há uma intermediária similaridade genética entre os grupos.

Recomenda-se introdução de diferentes touros nos rebanhos de búfalos de Rio para que se possa aumentar a variabilidade genética, diminuindo, assim, o grau de endogamia existente quando se analisa o indivíduo na população total.

Houve total separação entre os búfalos de Rio e de Pântano, *B. bubalis* var. *bubbalis* e *B. bubalis* var. *kerebau*, respectivamente, para $\Delta K=2$.

A Análise *Bayesiana* identificou as quatro raças bubalinas reconhecidas pela ABCB com precisão superior a 80 % para $\Delta K=5$.

A raça Carabao foi a mais pura (97,8%) dentre as quatro raças reconhecidas pela ABCB.

6. Referência Bibliográfica

ABCB (2013) - <http://www.bufalo.com.br/>

ALBUQUERQUE, M.S.M.; EGITO, A.A.; MARQUES, J.R.F. *et al.* Variabilidade genética em búfalos estimada por marcadores RAPD. *Pesq. Agrop. Bras.*, Brasília, v.41, n.4, p.623-628, 2006.

ALBUQUERQUE, M.S.M. Marcadores moleculares e variabilidade genética em búfalos do Brasil. 2005. 111f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. FMRP. São Paulo. Departamento de Genética.

ARAÚJO, A. M. Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA. 2004. 104f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L. et al. GENETIX v.4.05, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 2004.

CARNEIRO, T.X.; GONÇALVES, E.C.; SCHNEIDER, M.P.C. et al. Diversidade genética e influência de DNA microssatélite para o controle genealógico da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v.59, n.5, p.1257-1262, 2007.

EGITO, A.A.; PAIVA, S.R., ALBUQUERQUE, M.S. et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics*, 8:83, 2007.

ELBELTAGY, A. R.; GALAL, S., ABDELSALAM, A. Z. et al. Biodiversity in Mediterranean buffalo using two microsatellite multiplexes. *Livestock Sci.*, 114, pp.341-346, 2008.

FAO (2013). http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#VISUALIZE. acessado em 28/maio/2013.

GARGANI, M.; PARISET, L.; SOYSAL, M.I. et al. Genetic variation and relationships among Turkish water buffalo populations. *Anim. Genet.* – Short Communication, 41, p.93-96, 2009.

GOUDET, J. FSTAT. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). 2002 - URL: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

IBGE (2013) – <http://www.ibge.gov.br/>

KATHIRAVAN, P.; KATARIA, R.S.; MISHRA, B.P. Power of exclusion of 19 microsatellite markers for parentage testing in river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Mol. Biol. Rep.*, 39:8217–8223, 2012.

KUMAR, S., GUPTA, J., KUMAR, N. et al. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. *Molec. Ecol.*, 15, 593–600, 2006.

MACMANUS, C.; PAIVA, S.; CORRÊA, P.S. et al. Estatística para descrever Genética de Populações. In.: INCT – Série Técnica: Genética. Disponível em www.animal.unb.br. p.50. 07/01/2011.

MARCONDES, C.R.; MARQUES, J.R.F.; ARAÚJO, C.V. et al. Estruturação de dados para avaliação genética de bubalinos em rebanhos – Núcleo Pará: Resultados preliminares. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2011.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molec. Ecol.*, 7 (5): 639-655, 1998.

MARQUES, J.R.F.; MARTÍNEZ, A.M.; COSTA, M.R. et al. Genetic diversity of Brazilian buffaloes (*Bubalus bubalis*) using DNA microsatellites. *Arch. Zootec.*, 60 (232): 1213-1221, 2011.

MILLER, M. P. Tools for Population Genetics Analyses (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. [S.l.: s.n]. 1997. URL: <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>

NEI, M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106(949): 283-292, 1972

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

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6:288–95, 2006.

PIRES, D.A.F. Caracterização genética de remanescentes da raça equina nordestina em mesorregiões dos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí através de marcadores microssatélites. 2012. 101f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia. Área: Produção Animal.

PRITCHARD, J.K.; WEN, X.; FALUSH, D. Documentation for structure software: Version 2.3.4, 2012. URL: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GenePop (v 3.4): A population genetics software for exact tests and ecumenism. *J. of Heredity*, Washington D.C., v. 86, p. 248-249, 1995.

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

SANTIAGO, A.A. Histórico: Fundação, Pioneiros, Importadores, Estudo e Fomento. ABCB, São Paulo, 9p., 1960. Disponível em http://www.bufalo.com.br/info_criador.html. Acessado em 20/agosto/2012.

SOUZA, R.F. Noções de genética de populações: o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Disponível em: http://www.uel.br/pessoal/rogerio/6bio026/textos/genetica_populacoes_zootecnia.pdf. Acessado em 16/maio/2012.

VIEIRA, J.N. et al. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. PUBVET. Londrina. v. 5, n. 2, Ed. 149, Art. 1003. 2011.

VIJH, R.K.; TANTIA, M.S.; MISHRA, B. *et al.* Genetic relationship and diversity analysis of Indian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Sci.*, 86, pp.1495-1502, 2008.

YANG, W.C.; TANG, K.Q.; MEI, J. *et al.* Genetic diversity analysis of an indigenous Chinese buffalo breed and hybrids based on microsatellite data. *Genet. and Mol. Res.*, 2011.

WEIR, G.S. Genetic Data Analysis II. 2 ed. *Sinauer Associates Inc.*, Sunderland MA., 1996.

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

ZĄBEK, T.; RADKO, A.; SŁOTA, E. Implications for the use of horse hair roots as a DNA source for microsatellite typing. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (11): 499–502, 2005.

ZHANG, Y.; SUN, D.; YU, Y. et al. Genetic diversity and differentiation of Chinese domestic buffalo based on 30 microsatellite markers. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 38, 569–575, 2007.

ZHANG, Y.; VANKAN, D.; ZHANG, Y. et al. Genetic differentiation of water (*Bubalus bubalis*) populations in China. Nepal and south-east Asia: inferences on the region of domestication of the swamp buffalo. *Anim. Genet.*, 42, p.569-575, 2011.