

## MARCADORES RAPD NA ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE RAÇAS DE BOVINOS E NÚMERO DE *LOCOS* NECESSÁRIOS PARA A ESTABILIDADE DA DIVERGÊNCIA ESTIMADA

MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES<sup>1\*</sup>, MARIA SILVIA RODRIGUES MONTEIRO<sup>2</sup>, FLÁVIA MELO RODRIGUES<sup>3</sup>, THANNYA NASCIMENTO SOARES<sup>4</sup>, LUCILEIDE VILELA RESENDE<sup>4</sup>, ALLINY DAS GRAÇAS AMARAL<sup>4</sup> E PAULO ROBERTO MARRA<sup>1</sup>

1. Biólogos, Professores do Departamento de Zootecnia da Universidade Católica de Goiás - UCG.

2. Agrônoma, Professora do Departamento de Zootecnia da Universidade Católica de Goiás - UCG.

3. Bióloga, Professora do Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás - UCG.

4. Alunas do Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Católica de Goiás - UCG.

### RESUMO

Diversos marcadores moleculares vêm auxiliando tanto geneticistas como melhoristas na detecção da variabilidade genética das populações. O incremento na capacidade computacional tem permitido também a otimização dos delineamentos, reduzindo os custos e o esforço laboratorial. O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores RAPD em bovinos, avaliando o padrão de similaridade genética entre rebanhos e definindo o número mínimo de *locos* necessário para estabilizar a divergência genética estimada. O DNA de dois rebanhos nelore e um holandês, totalizando 66 animais, foi utilizado para as análises. Dos 40 *primers* testados, 16 não apresentaram um bom padrão de amplificação ou não

amplificaram. Os 24 *primers* restantes apresentaram 133 *locos*, sendo 65 deles polimórficos. Como esperado, uma análise de agrupamento UPGMA mostrou que os dois rebanhos nelore são mais próximos entre si, com similaridade genética (Jaccard) igual a 0,785. O holandês é o mais distante geneticamente do grupo dos nelore, com um valor médio de Jaccard igual a 0,589. Pelo *bootstrap* observa-se que um aumento no número de *locos* utilizados gera uma redução contínua nos desvios-padrão e nos coeficientes de variação e que 50 deve ser o número mínimo de *locos* necessário para que a estimativa da divergência genética entre essas amostras se torne estável.

PALAVRAS-CHAVE: Bovinos, divergência genética, marcador molecular, RAPD.

### SUMMARY

#### RAPD MARKERS IN THE ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERGENCE AMONG RACES OF BOVINE AND THE NUMBER OF LOCI NECESSARY FOR THE STABILITY OF THIS ESTIMATED DIVERGENCE

Several molecular markers are aiding both geneticists and breeders to detect and quantify the genetic variability within and among populations. The improvement in the computational capacity also allowed the optimization of experimental designs, reducing the economic costs and laboratorial efforts. The objective of this paper was to select RAPD markers in bovines, evaluating the pattern of genetic similarity among stocks and defining the minimum number of necessary *locos* for the stabilization estimated genetic divergence. DNA of two stocks (nelore and Dutchman), totaling 66 animals, was used for the analyses. Out of 40 "primers" tested, 16 didn't show a good amplification pattern

or didn't amplify. The remaining 24 presented 133 *locos*, out of which 65 were polymorphic. As expected, the UPGMA clustering showed that the two nelore stocks are close to each other, with genetic similarity (Jaccard) equal to 0,785. The Dutchman was genetically the most distant stock, with a medium Jaccard value to the two nelore equal to 0,589. The bootstrap showed that increasing the number of loci continuously reduced the coefficients of variation of Jaccard estimated among stocks and that 50 should be the minimum number of *locos* necessary to stabilize the genetic divergence among samples.

KEY WORDS: Bovine, genetic divergence, molecular marker, RAPD.

## INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares têm-se mostrado uma poderosa ferramenta no estudo tanto de populações naturais quanto domesticadas, auxiliando no descobrimento de muitos parâmetros genéticos importantes para a conservação e/ou para a utilização dos recursos genéticos das diversas espécies (Hillis et al., 1996; Ruane, 1999; Kantanen et al., 1999; Ritz, et al., 2000). Estes marcadores têm permitido um grande avanço tanto em estudos que visam à análise da variabilidade genética entre e dentro de populações quanto naqueles que pretendem acessar a variabilidade genética existente entre raças, espécies ou outros grupos taxonômicos (Blott et al., 1999; Mommens et al., 1999; Nagamine & Higuchi, 2001).

Dentro da classe de marcadores moleculares baseados na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é ainda uma das opções mais baratas e rápidas para acessar a variabilidade ao nível do DNA e especialmente útil em análises intraespecíficas. Estes marcadores têm a vantagem de amplificar tanto regiões do genoma que podem ser transcritas e/ou traduzidas, como regiões não-codificantes. Isso é importante quando o objetivo é avaliar a variação ao longo da maior parte do genoma da espécie (Williams et al., 1990; Hillis et al., 1996; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Por outro lado, o RAPD ainda é criticado pela baixa repetibilidade experimental, embora esse problema possa ser contornado com a utilização de muitos *primers* e de critérios mais rígidos no momento da interpretação dos resultados.

Os dados oriundos dos marcadores moleculares, entre outras aplicações, podem fornecer uma estimativa de distâncias ou similaridades genéticas que quantificam o grau de diferenciação entre dois táxons (conjunto de organismos). Portanto, permite a transformação de toda a informação genética disponível sobre as relações entre dois táxons em um único número que pode ser utilizado para proporcionar uma classificação objetiva e estável, tanto quanto possível, dos itens sob estudo (Weir, 1990; Dias, 1998; Hanotte et al., 2000; Edwards et al., 2000a; Giovambattista et al., 2000). Em termos aplicados,

as distâncias genéticas entre e dentro de populações podem ser utilizadas para direcionar estratégias de cruzamentos específicos, otimizar procedimentos para a conservação de recursos genéticos, detectar doenças genéticas importantes e investigar paternidade, dentre outras aplicações (Horín et al., 1999; Blott et al., 1999; Ruane, 1999; Edwards et al., 2000b).

Além disso, o incremento na capacidade computacional tem promovido grandes avanços no estabelecimento de parâmetros genéticos obtidos através de marcadores moleculares, permitindo a otimização dos delineamentos ao maximizar a quantidade de informação obtida, reduzindo simultaneamente os custos e o esforço laboratorial. Uma dessas possibilidades de otimização é estabelecer o número mínimo de “marcas” (*locos*) que são necessárias para conseguir uma estimativa precisa do parâmetro genético de interesse utilizando procedimentos de reamostragem (*bootstrap*). Esses procedimentos têm sido utilizados em genética de populações para avaliar a estabilidade dos agrupamentos obtidos a partir de distâncias genéticas e para estabelecer intervalos de confiança em modelos de desdobramento de variância e estrutura populacional (Weir, 1990; Meyer, 1995; Hillis et al., 1996; Manly, 1997). Entretanto, sua utilização associada à estimativa de parâmetros genéticos por RAPD pode ser particularmente importante, já que nesta técnica um número relativamente alto de *locos* é necessário para que os problemas na estimativa dos parâmetros sejam minimizados (Lynch & Milligan, 1994). Como isso exige um elevado esforço laboratorial, a aplicação de procedimentos de reamostragem pode fornecer um ponto de equilíbrio que permita reduzir esse esforço laboratorial ao mesmo tempo em que garante uma estimativa precisa dos parâmetros genéticos com um número mínimo de *primers*.

Neste trabalho, o objetivo foi selecionar marcadores moleculares do tipo RAPD para bovinos, avaliando o padrão de similaridade genética entre três rebanhos e utilizando um procedimento de reamostragem tipo *bootstrap* para definir o número mínimo de *locos* necessário para a estabilização do parâmetro que estima a divergência genética com base nos marcadores selecionados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi retirado, utilizando vacutainer com EDTA, sangue de 66 animais de duas raças bovinas. As amostras de sangue foram processadas em um *kit* de purificação de DNA (GFX) do fabricante Amersham Pharmacia Biotechä, específico para extração a partir de amostras de sangue. Os animais estavam distribuídos em três amostras: o rebanho A, com 20 indivíduos da raça nelore (Cara Limpa); o rebanho B, com 24 indivíduos da raça holandesa (Puro por Origem); e o rebanho C, com 22 animais da raça nelore (Puro por Origem).

O DNA dos indivíduos foi utilizado para a montagem de um *mix* com todos os animais de cada rebanho, contendo 3 ml de DNA de cada indivíduo, sendo estas misturas de DNAs chamadas, respectivamente, de *mix* A, B e C. Este procedimento foi utilizado com o intuito de minimizar os custos laboratoriais sem comprometer, no entanto, a obtenção de informações genéticas importantes sobre a divergência entre os rebanhos.

Os três *mix* de DNA foram utilizados para a seleção de *primers* de RAPD, das séries OPC e OPP, desenvolvidos pela OPERONä, sendo testados 20 *primers* da série OPC e 20 da série OPP, com um tamanho médio de 10 bases. Para a amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR), no termociclador, foi utilizado um programa com os seguintes passos: (1°) desnaturação do DNA a 96°C por 3 minutos e (2°) a 92°C por 1 minuto; (3°) anelamento do *primer* a 35°C por 1 minuto; extensão da molécula pela enzima Taq polimerase (fornecida pela Amersham Pharmacia Biotechä) a 72°C por 2 minutos; (5°) 40 ciclos seguindo do 2° ao 4° passos; (6°) passo final de extensão de 3 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados.

O padrão de amplificação dos fragmentos foi analisado através da técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, utilizando tampão de corrida TBE (Tris Borato EDTA – 1X). Os géis foram corados com brometo de etídio, os fragmentos visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta e em seguida fotografados para posterior interpretação (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os *primers* selecionados que apresentaram um melhor padrão de bandas (ver resultados) foram uti-

lizados para a construção de uma matriz de similaridade entre os pares de rebanhos, com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard ( $S_{ij}$ ) (Dias, 1998), codificando a presença da banda no gel como 1 e a sua ausência como 0. O coeficiente de Jaccard ( $S_{ij}$ ) entre pares de rebanhos é dado por

$$S_{i,j} = \frac{a}{a + b + c},$$

em que “a” é o número de *locos* comuns aos rebanhos i e j, enquanto que “b” e “c” são os números de *locos* presentes apenas em cada um dos rebanhos. Valores de  $S_{ij}$  próximos a 1,0 indicam elevada semelhança genética entre os rebanhos.

A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, a matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average). Neste método, o critério utilizado para a formação dos grupos é a média das distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo, como a própria denominação informa. A distância intergrupo é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos (Dias, 1998).

O conjunto de dados obtido foi utilizado em um procedimento de reamostragem sobre os *locos* denominado *bootstrap*. Esse procedimento computacional consiste em reamostrar os *locos* da matriz de dados dos genótipos, com reposição, recalculando as estatísticas desejadas diversas vezes. Neste trabalho, esse procedimento foi utilizado para testar a estabilidade das distâncias genéticas quando estas são estimadas a partir de um número crescente de *locos*. Para tal, foram feitas 1.200 reamostragens da matriz de dados originais, sendo cada conjunto de 200 matrizes construído com diferentes números de *locos* (10, 25, 50, 75, 100 e 125 *locos*).

Em seguida, foram recalculados os índices de Jaccard entre as três amostras para cada uma das matrizes. Em cada conjunto de 200 matrizes de similaridade foram estimados os valores médios, desvio-padrão e coeficiente de variação, para cada coeficiente de Jaccard, calculado par a par entre as amostras ( $S_{ij}$ ), e para o Jaccard médio na matriz, que expressa o padrão global da divergência genética entre os rebanhos.

As análises de divergência genética (Coeficiente de Jaccard e UPGMA) foram realizadas utilizando o pacote NTSYS 1.5 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 1989). O procedimento de *bootstrap* foi realizado utilizando o programa SUBRAPD, escrito em linguagem Basic por José Alexandre F. Diniz Filho para este trabalho.

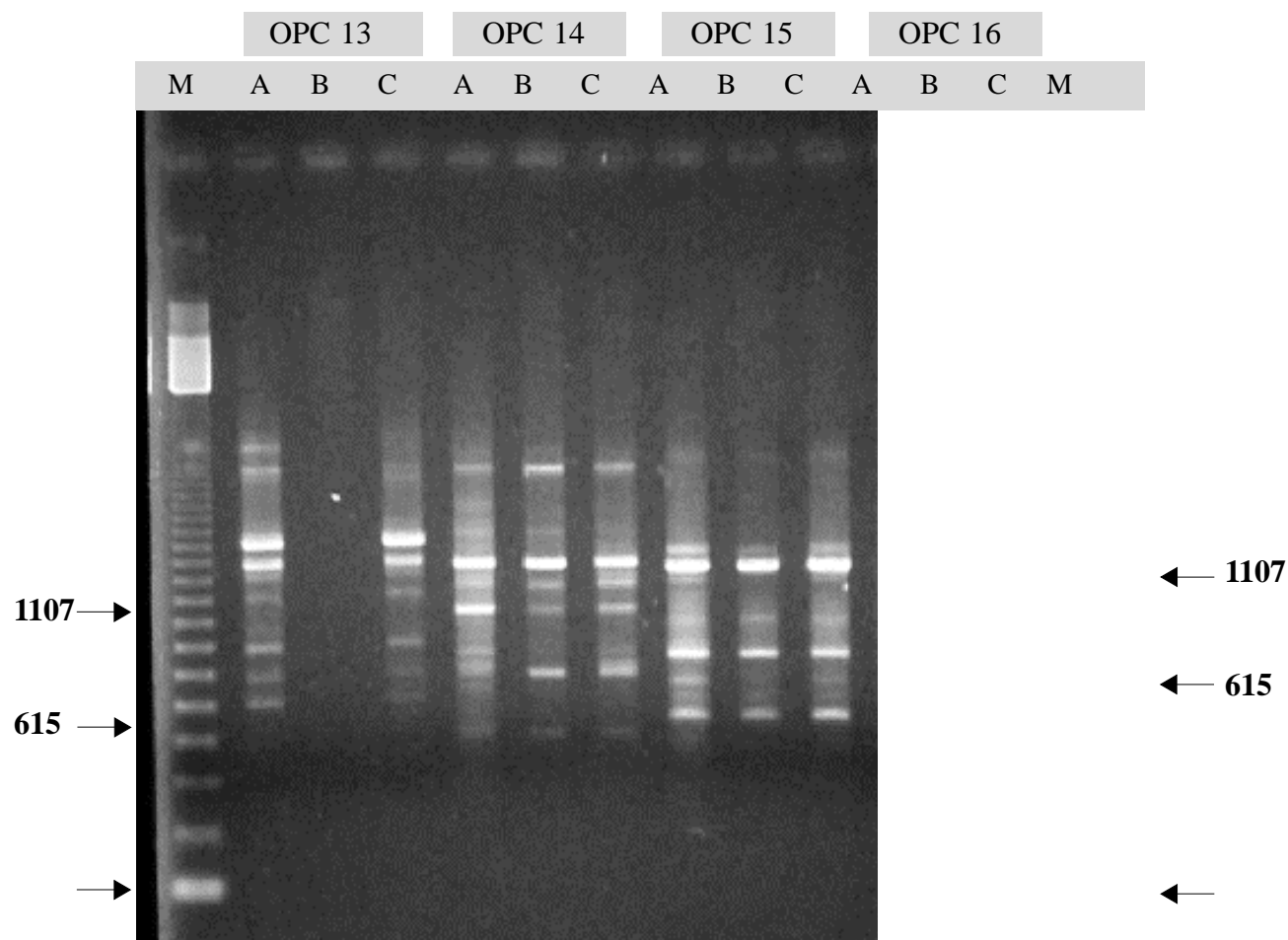
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção dos melhores marcadores

Dos 40 *primers* testados, 16 deles não amplificaram ou não apresentaram um bom padrão de amplificação (Figura 1). Os 24 *primers* restantes mostraram um bom padrão de amplificação e apresentaram um total de 133 *locos*, sendo 65 deles

polimórficos. O número médio de *locos* encontrado foi 5,5, sendo o mínimo 2 e o máximo 10 *locos* por *primer* analisado (Tabela 1).

Esta análise prévia é importante pois permite a escolha de “marcas” mais informativas para prosseguir as análises com um maior número de indivíduos e/ou rebanhos. Estas informações iniciais fazem com que o pesquisador possa minimizar tanto o esforço de trabalho laboratorial quanto os custos da análise, escolhendo apenas os *primers* que apresentarem, de fato, um melhor padrão de amplificação e um maior número de *locos*, maximizando a relação custo-benefício. Entretanto, é necessário saber quantos desses *locos*, em diferentes combinações, são necessários para estimar precisamente um dado parâmetro genético.



**FIGURA 1.** Fragmentos RAPD amplificados com quatro *primers* da série OPC para os *mix* de DNA A, B e C. As colunas “M” indicam o marcador de peso molecular (123 base pair ladder, GIBCO BRL).

**TABELA 1.** Relação do número de *locos* e do número de *locos* polimórficos por *primer* selecionados para os diferentes rebanhos de bovinos.

<i>Primer</i>	Nº de <i>locos</i>	Nº de <i>locos</i> polimórficos
OPC – 1	4	3
OPC – 2	6	4
OPC – 5	10	6
OPC – 6	4	2
OPC – 9	6	3
OPC – 10	3	0
OPC – 14	7	1
OPC – 15	5	1
OPC – 16	3	3
OPC – 17	5	3
OPC – 19	5	2
OPC – 20	4	3
OPP – 1	3	1
OPP – 4	5	2
OPP – 6	4	2
OPP – 7	9	5
OPP – 8	7	5
OPP – 9	4	0
OPP – 11	4	4
OPP – 12	8	3
OPP – 13	2	1
OPP – 14	9	5
OPP – 15	6	2
OPP – 17	10	4
TOTAL	133	65

#### Divergência genética

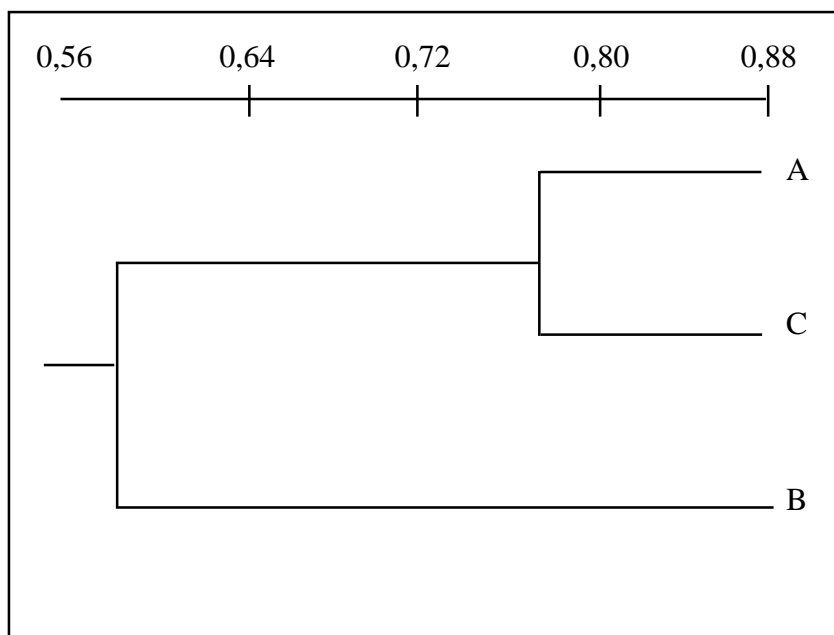
A análise de divergência genética, feita com base nos 24 *primers* selecionados (133 *locos*), indicou que os rebanhos nelore Cara Limpa (A) e Puro por Origem (C) são mais próximos entre si, com valor de Jaccard igual a 0,785. O holandês mostrou-se mais distante geneticamente em relação ao grupo nelore, com um valor médio de Jaccard igual a 0,589 (Tabela 2). Essas relações estão representadas graficamente no dendograma obtido a partir do UPGMA

(Figura 2). É importante destacar que esse polimorfismo representa apenas a divergência máxima “entre” os rebanhos, já que foi utilizado um *mix* de DNA de cada um deles. Portanto, as diferenças encontradas estão em função apenas de *locos* que “marcam” as amostras de cada um dos rebanhos.

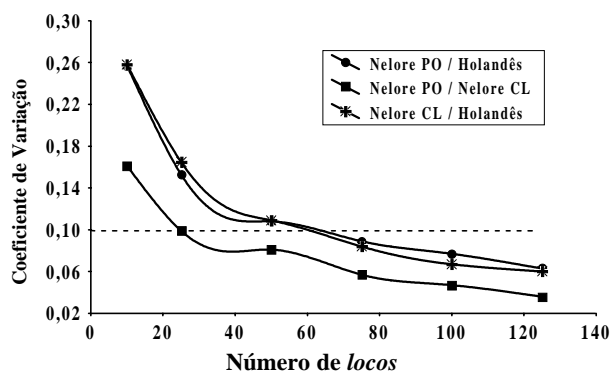
Os resultados da análise de divergência estão de acordo com o esperado, já que o nelore é considerado por alguns autores como sendo da subespécie *Bos taurus indicus*, enquanto o holandês pertence à subespécie *Bos taurus taurus* (Manwell & Baker, 1980; Meirelles et al., 1999; Clutton-Brock, 1999). O estabelecimento desses padrões de divergência genética fornece uma informação inicial sobre a variabilidade genética existente entre esses rebanhos, estimada a partir de uma técnica relativamente simples como o RAPD. Assim, o polimorfismo encontrado e a sua coerência com o esquema conhecido de diferenciação racial sugerem que essa técnica pode ser útil em programas de melhoramento e manejo (por exemplo, permitindo adotar estratégias ótimas de cruzamentos), bem como na definição do grau de mistura racial existente nos rebanhos.

#### Estabilização da estimativa de divergência genética

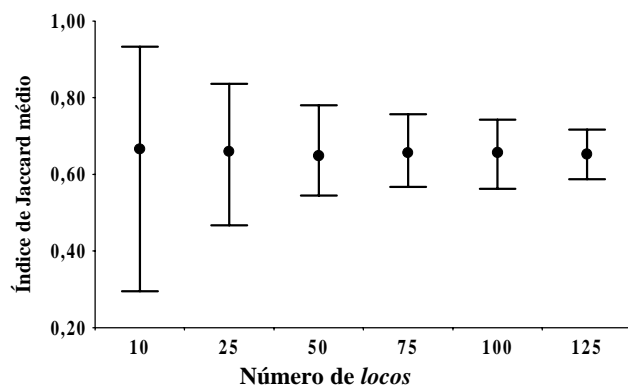
As estatísticas descritivas referentes aos coeficientes de Jaccard (par-a-par e Jaccard médio), obtidos a partir das 200 matrizes de similaridade, por *bootstrap* com diferentes números de *locos* (Tabelas 3 e 4), mostram que os valores médios dos coeficientes de Jaccard tendem a ser estáveis mesmo quando calculado com poucos *locos* (Figura 3). Entretanto, à medida que o número de *locos* utilizados aumenta, percebe-se que há uma redução contínua nos desvios-padrão e, conseqüentemente, nos coeficientes de variação (Figuras 3 e 4). A maior redução nesses coeficientes, em todos os índices analisados, ocorre no intervalo entre 10 e 50 *locos*. Observa-se que, para a divergência entre os dois rebanhos de nelore, o coeficiente de variação do Jaccard torna-se menor que 10% a partir da utilização de apenas 25 *locos*, o que pode ser explicado pela maior similaridade entre esses dois rebanhos. Já para a divergência entre os nelore em relação ao holandês, esse valor no coeficiente de variação só é atingido a partir de 60 *locos*. A análise combinada



**Figura 2.** Análise de agrupamento UPGMA mostrando o relacionamento entre três raças de bovinos, com base no coeficiente de similaridade de Jaccard a partir do total dos 133 *locos* analisados.



**FIGURA 3.** Relação entre os coeficientes de variação ( $CV_1$ ,  $CV_2$ ,  $CV_3$ ) dos índices de Jaccard par-a-par (Tabela 3) obtidos por *bootstrap* e o número de *locos* utilizados para estimar cada coeficiente. A linha tracejada indica o valor mínimo para definir a estabilidade do coeficiente de variação.



**FIGURA 4.** Valores médios, mínimos e máximos obtidos por *bootstrap* para o coeficiente de Jaccard Médio ( $J_M$ ), com diferentes números de *locos*.

**TABELA 2.** Similaridade (diagonal inferior) e distância (diagonal superior) de Jaccard entre os rebanhos A, B e C.

	A	B	C
A	-	0,409	0,215
B	0,591	-	0,413
C	0,785	0,587	-

**TABELA 3.** Estatística descritiva (média, desvio-padrão e coeficiente de variação – M, DP e CV, respectivamente), para os coeficientes de Jaccard obtidos por *bootstrap* com diferentes números de *locos*.  $J_1$  refere-se à similaridade entre os rebanhos A e B,  $J_2$  à similaridade entre os rebanhos A e C e  $J_3$  à similaridade entre os rebanhos B e C.

N.º de <i>locos</i>	$MJ_1 \pm DP_1$	$CV_1$	$MJ_2 \pm DP_2$	$CV_2$	$MJ_3 \pm DP_3$	$CV_3$
10	0,595 ± 0,153	0,257	0,794 ± 0,127	0,161	0,608 ± 0,157	0,258
25	0,591 ± 0,091	0,153	0,793 ± 0,078	0,099	0,591 ± 0,098	0,165
50	0,583 ± 0,063	0,108	0,788 ± 0,063	0,081	0,576 ± 0,063	0,109
75	0,587 ± 0,052	0,089	0,787 ± 0,044	0,057	0,594 ± 0,050	0,084
100	0,591 ± 0,045	0,077	0,789 ± 0,037	0,047	0,591 ± 0,040	0,067
125	0,587 ± 0,037	0,063	0,786 ± 0,028	0,036	0,586 ± 0,035	0,060

**TABELA 4.** Estatística descritiva (média, desvio-padrão, máximo e mínimo - M, DP, MAX e MIN, respectivamente), para os coeficientes de Jaccard médios ( $J_M$ ) obtidos por *bootstrap* com diferentes números de *locos*.

N.º de <i>locos</i>	$MJ_M \pm DP_M$	$CV_M$	MAX – $J_M$	MIN – $J_M$
10	0,666 ± 0,112	0,168	0,933	0,295
25	0,659 ± 0,066	0,100	0,836	0,467
50	0,649 ± 0,049	0,076	0,780	0,545
75	0,656 ± 0,037	0,056	0,757	0,567
100	0,657 ± 0,033	0,050	0,743	0,562
125	0,653 ± 0,026	0,040	0,717	0,587

da divergência através do Jaccard médio indica que os coeficientes de variação passam a ser menores que 10% quando são utilizados entre 25 e 50 *locos*.

Assim, um número mínimo de *locos* suficiente para estimar de modo conservativo a divergência genética entre essas amostras está em torno de 50 *locos*. Esse número pode ser atingido facilmente analisando as amostras com um número menor de *primers*, mas que possuam cada um deles número elevado de *locos*. Por exemplo, a utilização dos *primers* OPC-5, OPP-7, OPP-8, OPP-12, OPP-14 e OPP-17 resultaria em um número conservativo de 53 *locos* para a análise (pois novos *locos* podem aparecer em outros rebanhos). Assim, seria possível obter resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo utilizando menos de um quarto dos *primers* testados e analisados neste trabalho. Isso

torna possível reduzir drasticamente o esforço laboratorial e os custos dos trabalhos sem que haja perda de informação significativa, em estudos futuros com esses ou outros rebanhos.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a técnica de RAPD pode ser útil para caracterizar geneticamente rebanhos bovinos, considerando a qualidade da amplificação e o nível do polimorfismo entre rebanhos. Mais importante, uma análise da estabilidade do coeficiente de similaridade genética através de *bootstrap* mostrou que apenas seis *primers* podem ser suficientes para uma estimativa estável da divergência genética entre os rebanhos bovinos. Portanto, em pesquisas que necessitem de um grande

número de indivíduos ou rebanhos, este resultado auxilia na minimização dos custos sem comprometer a obtenção da quantidade de informação necessária.

Os autores agradecem ao Dr. José Alexandre F. Diniz Filho, do Departamento de Biologia da UFG, pelo auxílio durante o planejamento e na análise dos dados. E também pelo auxílio financeiro da Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado de Goiás (Sectec), através do programa Conciteg, e da Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás.

### REFERÊNCIAS

- BLOTT, S. C.; WILLIAMS, J. L.; HALEY, C. S. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*, v. 82, n. 6, p. 613-619, 1999.
- BLOTT, S. C.; WILLIAMS, J. L.; HALEY, C. S. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*, v. 82, n. 6, p. 613-619, 1999.
- CLUTTON-BROCK, J. *A natural history of domesticated mammals*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa: UFV, 1998.
- EDWARDS, C. J.; GAILLARD, C.; BRADLEY, D. G.; MACHUGH, D. E. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Animal Genetics*, v. 31, n. 2, p. 127-130, 2000b.
- EDWARDS, C. J.; LOFTUS, R. T.; BRADLEY, D. G.; LOOFT, G. D. C. Relationships between the endangered pustertaler-sprinzen and three related European cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. *Animal Genetics*, v. 31, n. 5, p. 329-332, 2000a.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1998.
- GIOVAMBATTISTA, G.; RIPOLI, M. V.; DE LUCA, J. C.; MIROL, P. M.; LIRÓN, J. P.; DULOUT, F. N. Male-mediated introgression of *Bos indicus* genes into argentine and bolivian creole cattle breeds. *Animal Genetics*, v. 31, n. 5, p. 302-305, 2000.
- HANOTTE, O.; TAWAH, C. L.; BRADLEY, D. G.; OKOMO, M.; VERJEE, Y.; OCHIENG, J.; REGE, J. E. O. Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indice *Bos indicus* Y apecific allele amongst sub-Saharan African cattle breeds. *Molecular Ecology*, v. 9, n. 4, p. 387-396, 2000.
- HILLIS D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.
- HORÍN, P.; RYCHLÍK, I.; TEMPLETON, J. W.; ADAMS, L. G. A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene. *European Journal of Immunogenetics*, v. 26, n. 4, p. 311-313, 1999.
- KANTANEN, J.; OLSAKER, L. I.; ADALSTAINSSON, S.; SANDBERG, K.; EYTHORSDOTTIR, E.; PIRHONEN, K.; HOLM, L-E. Temporal changes in genetic variation of north european cattle breeds. *Animal Genetics*, v. 30, n. 1, p. 16-28, 1999.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, v. 3, p. 91-99, 1994.
- MANLY, B. F. J. *Randomization and Monte Carlo Methods in Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- MANWELL, C.; BAKER, C. M. A. Chemical classification of cattle: 2. Phylogenetic tree and species status of the zebu, animal and blood groups. *Biochemical Genetics*, v. 11, p. 151-162, 1980.
- MEIRELLES, F. V.; ROSA, A. J. M.; LÔBO, R. B.; GARCIA, J. M.; SMITH, L. C.; DUARTE, F. A. M. Is the american zebu really *Bos indicus*?. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, n. 4, p. 543-546, 1999.



- MEYER, D. Árvores evolutivas humanas: uma discussão sobre inferência filogenética. *Série Monografias*, v. 3. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.
- MOMMENS, G.; PEELMAN, L. J.; VAN-ZEVEREN, A.; IETEREN, G. D.; WISSOCQ, N. Microsatellite variation between an african and five european taurine breeds results in a geographical phylogenetic tree with a bison outgroup. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 116, n. 5, p. 325-330, 1999.
- NAGAMINE, HIGUCHI. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 118, n. 2, p. 101-109, 2001.
- RITZ, L. R.; GLOWATZKI-MULLIS, M-L.; MACHUGH, D. E.; GAILLARD, C. Phylogenetic analysis of the tribe bovini using microsatellites. *Animal Genetics*, v. 31, n. 3, p. 178-185, 2000.
- ROHLF, F. J. *NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. New York: Exeter Publishers, 1989.
- RUANE, J. A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 116, n. 5, p. 317-323, 1999.
- WEIR, B. W. *Genetic Data Analysis: Methods For Discrete Population Genetic Data*. Sunderland: Sinauer, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6.531-6.535, 1990.