

SAMUEL REZENDE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS NO BRASIL
COM QUATRO TÉCNICAS MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

SAMUEL REZENDE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS NO BRASIL
COM QUATRO TÉCNICAS MOLECULARES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 14 de dezembro de 2005.

Pesquisador Arthur da Silva Mariante
(Conselheiro)

Prof. Luiz Orlando Oliveira
(Conselheiro)

Prof^a. Concepta McManus Pimentel

Prof^a. Thea Mirian Medeiros Machado

Prof. Jorge A. Dergam dos Santos
(Orientador)

Aos meus pais Márcia e Arnaldo e minha esposa Danielle

Por acreditarem em mim...

Por todo o amor...

Por me ensinarem que todos nossos sonhos podem se realizar e o limite deles tende ao infinito!!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

À Embrapa, CNPq, Universidade Federal de Viçosa e a Universidade de Brasília pelo financiamento do projeto.

Ao professor, ou melhor, ao meu grande amigo Jorge Abdala Dergam dos Santos, pela confiança, pelo incentivo, pelos “bate-papos” e pela orientação!!

Ao meu supervisor e amigo, Arthur Mariante, pelo grande apoio, confiança e oportunidade dentro da Embrapa. É um grande exemplo de profissional a ser seguido!

À professora Connie McManus da UnB, pela amizade, carinho, paciência e extrema boa vontade durante todas as etapas da tese!

À professora Thea Machado do DZO, pelas preciosas sugestões e colaborações durante a tese.

Ao professor Luiz Orlando, pela paciência e valiosas sugestões para confecção da tese.

À professora Simone Guimarães do Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC)/ DZO pela amizade, confiança e pelo auxílio na execução das análises de mtDNA e microssatélites.

Aos colegas da equipe de recursos genéticos animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Andréa Egito, Socorro Maués, Sílvia Castro

e José Roberto Moreira pela confiança, pelo carinho e acolhimento dentro da Embrapa.

A todos os estudantes e amigos do Laboratório de Genética Animal (LGA)/ Cenargen e LABTEC que auxiliaram diretamente em alguma parte da tese. Dessa forma, o meu muito obrigado a Bruna, Débora, Vanessa, Jane, César, Ana Flávia e Carla.

A todos os estudantes que estão atualmente ou passaram pelo LGA, Leonardo, Aline, Paloma, Beatriz, Rejane e tantos outros. Os meus sinceros agradecimentos pela ajuda nos momentos iniciais de adaptação em Brasília.

A todas as pessoas que enviaram amostras para execução deste trabalho, sejam de outras Unidades da Embrapa, Universidades, Empresas Estaduais de Pesquisas e até mesmo criadores. Sem a ajuda e compreensão de vocês esse trabalho seria incompleto.

Por último, mas nadinha de menos importante (Pelo contrário!!) gostaria de agradecer:

- Aos meus pais Arnaldo e Márcia por todo amor, confiança e por fazerem de mim a pessoa que eu sou hoje!

- Ao meu grande amor, a minha esposa DANY! Sem ela nada disso teria acontecido ou teria acontecido pela milésima parte. Pois ela que me apoiou em todos os momentos, seja no laboratório, seja em casa. Foi extremamente compreensiva e paciente por todas as viagens, noites “viradas” no computador, reuniões, enfim, foi tudo que um homem poderia sonhar em uma mulher!

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação...o meu MUITO OBRIGADO! Farei o possível para valer esse título!

BIOGRAFIA

SAMUEL REZENDE PAIVA, filho de Arnaldo Vilela Paiva e Márcia Rezende Paiva, nasceu em Resende, Rio de Janeiro, em nove de julho de 1977.

Em 13 de agosto de 1999, graduou-se Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em 28 de agosto de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, realizando estudos na área de Genética Molecular Animal.

Em 13 de agosto de 2001, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

No primeiro dia de setembro de 2001, iniciou o curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, continuando pesquisas na área de Genética Molecular Animal.

Em 06 de maio de 2002 foi contratado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF para desenvolver pesquisas na área de Conservação de Recursos Genéticos Animais.

Em 14 de dezembro de 2005, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL e JUSTIFICATIVAS.....	1
OBJETIVOS.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAPÍTULO 1: Genetic variability of the main Brazilian hair sheep breeds using RAPD-PCR markers and conservation implications...	15
CAPÍTULO 2: Diversidade genética e estrutura de populações das principais raças locais de <i>Ovis aries</i> no Brasil por meio de marcadores microssatélites.....	28
CAPÍTULO 3: Inferências sobre a origem das principais raças de ovinos naturalizadas brasileiras a partir de marcadores moleculares RFLP-PCR.....	74
CAPÍTULO 4: Estrutura genética de <i>Ovis aries</i> no Brasil com base em dados da região-controle do mtDNA.....	80
CAPÍTULO 5: Identificação de polimorfismos no cromossomo Y de <i>Ovis aries</i> no Brasil.....	100
CONCLUSÕES GERAIS.....	108

RESUMO

PAIVA, Samuel Rezende, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2005. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Conselheiros: Luiz Orlando de Oliveira e Arthur da Silva Mariante.

Os ovinos foram introduzidos no Brasil principalmente pelos portugueses e espanhóis durante o processo de colonização. Por motivos sócio-culturais, a criação desses animais foi considerada no Brasil uma atividade de categoria inferior, de modo que foram criados somente para subsistência. Esse descaso fez com que os produtos derivados de ovinos (lã, carne, pele) perdessem competitividade frente aos produtores de outros países. Para que ocorra uma mudança desse cenário, é necessária uma profunda modificação logística de todas as classes envolvidas na produção de ovinos, visto que os ovinos representam, principalmente nas regiões Sul e Nordeste, uma fonte de recursos importante do ponto de vista social, cultural e histórico. O objetivo desse trabalho foi realizar um conjunto de técnicas moleculares que permitam a caracterização genética das principais raças e/ou estoques de ovinos naturalizados do Brasil de modo a oferecer subsídios para a elaboração de programas estratégicos de conservação e melhoramento desta espécie. Foram utilizadas quatro classes de marcadores moleculares (RAPD, microssatélites, sequenciamento do DNA mitocondrial e do cromossomo Y) em até 11 raças de ovinos naturalizadas e comerciais existentes no Brasil. Os resultados permitiram identificar padrões de estruturação genética existentes nessa espécie no Brasil, bem como demonstraram a viabilidade de aplicação de

marcadores moleculares para: 1) monitoramento genético de rebanhos; 2) testes de exclusão de paternidade para controle de pedigrees; 3) origem geográfica de raças ou populações; 4) inferências filogenéticas intra-específicas.

ABSTRACT

PAIVA, Samuel Rezende, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2005.
Genetic characterization of Brazilian sheep breeds by means of four molecular techniques. Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos.
Committee Members: Luiz Orlando de Oliveira and Arthur da Silva Mariante.

In Brazil, sheep breeds were introduced during the colonization process by Spanish and Portuguese settlers. Social and cultural factors determined that sheep rearing was considered a low-status activity, and therefore, sheep were raised only to meet subsistence goals. The outcome of this is that products derived from sheep such as wool, meat and hides are non competitive in the international market. A change of this scenario requires a profound logistic alteration involving all sheep production-related groups, particularly in the northern and southern regions in the country, where sheep are of high cultural, social and historical relevance. The objective of this work was to characterize the main naturalized Brazilian sheep breeds using molecular markers. Our results will be a baseline for the development of management and conservation programs. Four kinds of molecular markers were used (RAPD, microsatellites, and sequences of mtDNA and Y chromosome) and were applied on 11 breeds of naturalized and commercial breeds. Results identified the genetic structure of the species in the Country and demonstrated the efficiency of molecular markers for 1) herd genetic monitoring, 2) paternity (exclusion) analyses, 3) for determining the geographic origin of breeds and populations, and 4) for investigating within-species phylogenies.

INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVAS

O Brasil possui diversas raças de animais domésticos que se desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses e espanhóis logo após o descobrimento. Ao longo desses cinco séculos, estes animais ficaram sob a ação da seleção natural em determinados ambientes, a ponto de apresentarem características específicas de adaptação às novas condições (Mariane *et al.*, 1999). Estes grupos altamente adaptados passaram a ser conhecidos como raças “crioulas”, “locais” ou “naturalizadas”, as quais podem apresentar vantagens em regimes de produção extensiva, quando comparadas com raças recém chegadas à determinada região ou ao País. Hoje, grande parte destes rebanhos encontra-se ameaçado de extinção, principalmente em razão de cruzamentos absorventes indiscriminados com animais de raças exóticas/ modernas que passaram a ser importadas a partir do final do século XIX e início do século XX (Morais, 2001).

Levantamentos realizados sob a coordenação da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) sobre a situação das sete principais espécies de animais domésticos, têm mostrado que existe uma grande quantidade de raças ameaçadas de extinção em todo o mundo (FAO, 2001). O Sistema de Informações sobre a Diversidade de Animais Domésticos (DAD-IS) da FAO, comprovou que há uma taxa de extinção, em nível mundial, de 48 raças ao ano, próximo à perda de uma raça a cada semana. Recentemente, estimativas da FAO (2001) indicaram que cerca de 30% das 3.882 raças de animais domésticos existentes estão em vias de extinção.

Dessa forma, a conservação e o melhoramento de raças naturalizadas justificam-se, atualmente, no contexto de obtenção de animais para diversos fins, inclusive para a realização de cruzamentos controlados. Entretanto, para alcançar esse nível, é necessário que se encontre o sistema de produção que mais evidencie todo potencial destas raças, criando-se assim interesse por parte dos criadores, ao perceberem que podem utilizar as raças locais e obter um maior retorno financeiro. Adicionalmente, a conservação dessas raças só se justifica se estiver intimamente relacionado à sua utilização, o que aumenta ainda mais a importância da parceria entre pesquisadores e criadores para o sucesso de sua conservação. Assegurar a sobrevivência dessas raças seja

nas instituições públicas ou com criadores irá permitir, segundo Notter (1998), que no futuro, as mesmas possam vir a constituir fonte de material genético capaz de melhorar a resistência de outras raças a condições desfavoráveis do ambiente de criação. Um exemplo típico que pode ser citado no Brasil é o da ovelha Crioula Lanada. Essa raça teve um aumento considerável no número de seus rebanhos, a partir do momento em que os criadores perceberam que havia um mercado para lã colorida natural. Embora a indústria não tenha interesse na lã multicolorida, por ser considerada suja, essa lã tem grande utilização no artesanato no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina tem crescido a cada ano.

As raças naturalizadas de ovinos brasileiras são, em geral, animais de pequeno porte, e, até o momento, foram submetidos a baixas taxas de seleção artificial e melhoramento genético, sendo pouco especializados na produção intensiva de leite e/ou carne. Possuem, em geral, alta resistência às doenças e parasitas. Assim, Bricarello *et al.* (2004), identificaram que cordeiros da raça Crioula Lanada, no Rio Grande do Sul, apresentaram resistência elevada às infecções por *Haemonchus contortus* quando comparados com animais da raça Corriedale na mesma região. Amarante *et al.* (2004), verificaram que ovelhas da raça Santa Inês foram mais resistentes do que raças tradicionalmente comerciais como Ile de France e Suffolk no Estado de São Paulo. Por motivos sócio-econômicos e culturais, a criação desses animais foi considerada no Brasil uma atividade de categoria inferior, de modo que foi mantida geralmente para subsistência, a exceção das grandes cabanhas de beneficiamento de lã no sul do país nas décadas de 70 e 80. Esse relativo descaso, segundo Moraes (2000), fez com que os produtos brasileiros derivados de ovinos (lã, carne, pele) perdessem competitividade frente aos produtores de outros países, que por sua vez, avançaram grandemente no campo do melhoramento genético de características de produção, bem como na conservação de seus estoques de raças naturais.

Atualmente o Brasil apresenta várias raças de ovinos que podem ser divididas em naturalizadas ou comerciais/ exóticas (recentemente introduzidas país). A raça nordestina Santa Inês, oriunda provavelmente do estado da Bahia, está presente em todo o Nordeste e alguns estados do Sudeste e Centro-oeste do Brasil e, no momento, encontra-se em grande fase de expansão visto ser um dos grupos de ovinos com maior importância econômica

em função do seu porte e adaptação ao ambiente. Segundo Figueiredo *et al.* (1990), estes animais são descendentes do cruzamento da raça Bergamácia (lanada) com a Morada Nova (deslanada) e animais crioulos do Nordeste. Estes estoques ancestrais (crioulos) provavelmente foram de tipos nativos vindos da África e, possivelmente, ao longo dos anos, houve um período de seleção para ausência de lã destes animais cruzados. Entretanto, existe muita controvérsia acerca da origem destes animais. Miranda (1990) argumenta que a raça Bergamácia chegou ao Brasil apenas há cerca de 70 anos, um tempo muito curto para formar uma nova raça. Adicionalmente, a partir da década de 90, percebe-se na morfologia externa dos animais Santa Inês a presença de características da raça Somalis Brasileira e de outras raças lanadas, principalmente, a raça inglesa Suffolk. Mas o fato mais determinante, foi que a designação Santa Inês apenas é encontrada na literatura a partir do final da década de 70 com a homologação da “raça” pelo Ministério da Agricultura por meio da Portaria nº05 de 02 de março de 1978. Na descrição original da raça, os machos adultos são colocados como pesando em torno de 80 kg, contudo hoje, muitos dos reprodutores vendidos em exposições pesam mais de 120 kg. Parte desse ganho pode ser justificado pelos avanços no campo da nutrição animal, contudo, esse ganho é improvável de ter sido obtido por meio de melhoramento genético clássico a não ser a partir do uso de raças exóticas de maior porte para aumentar o quarto trazeiro do Santa Inês.

Os animais pertencentes à raça Morada Nova são animais bastante rústicos que se adaptaram às regiões mais áridas, desempenhando importantes funções sociais no Nordeste brasileiro. A raça é caracterizada pela ausência de lã, pelagem vermelha ou branca, com ponta da cauda branca e cascos pretos. Sua origem não é bem conhecida. Contudo, sua identificação e nomeação foram realizadas pelo Professor e Zootecnista Otávio Domingues nos Estados do Ceará e Piauí durante as décadas de 30 e 40 (Domingues, 1941). Os animais desta raça apresentam grande eficiência de produção, mesmo tendo de buscar seu alimento na rústica vegetação de caatinga. Produzem carne e, principalmente, peles de ótima qualidade. As ovelhas são muito prolíferas. Segundo Domingues (1954), sua origem pode estar no carneiro Bordaleiro português, que foi introduzido ao Brasil na época do povoamento dos sertões. Contudo, Mason (1980) argumenta que essa raça é

proveniente da África Ocidental (Mason, 1980) ou mesmo ser resultados de cruzamentos de raças portuguesas e africanas.

A raça Somalis Brasileira pertence ao grupo de ovinos de “garupa gorda”. São animais de porte médio, rústicos, deslanados ou com pouca lã. Suas características principais são: a cabeça e o pescoço negro, sendo permitido a tonalidade parda; são mochos e possuem pouca lã. A anca e cauda são constituídas por um reservatório de gordura, acumulada nas fases de abundância de recursos e utilizada na manutenção do animal durante as fases de escassez de alimentos. Segundo Vieira (1967), esta raça é originária da Ásia Central, descendente direto do Black Head Persian e também é muito criada na China e Sibéria. A sua introdução no Brasil, de acordo com Pinheiro Jr. (1973), foi feita por criadores do Estado do Rio de Janeiro. Mendes (1993) complementa informando que os primeiros casais que se tem registro foram introduzidos em 1931 no Brasil. Atualmente esta raça está bem adaptada ao Brasil e é muito usada para cruzamentos com as raças Santa Inês e Morada Nova.

A raça Rabo Largo, que tem o seu nome em função do depósito de gordura na cauda, é encontrada no Nordeste do Brasil, com os maiores efetivos no Estado da Bahia. Esta raça, provavelmente, se originou do cruzamento entre animais deslanados de cauda gorda, trazidos da África do Sul em 1868 (Mendonça, 1951) com os animais crioulos. São brancos, malhados ou brancos com a cabeça colorida e ambos os sexos possuem cornos. Adicionalmente, de acordo com Araújo (1988), a origem etiológica do Rabo Largo é o Carneiro do Sudão, apontando-se a variedade Nilótica como a mais característica. Segundo Mendes (1996), essa raça pode ainda ter sofrido influência de cruzamentos com a raça Merino que existia na Bahia na época.

Dentre as raças lanadas naturalizadas, a raça Bergamácia Brasileira pode ser considerada mista, produzindo tanto lã, quanto leite e carne. É uma raça rústica originária do norte da Itália que se adaptou bem às regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil (Vieira, 1967). Contudo, sua introdução no Brasil é relativamente recente, datando do início do século passado (Miranda, 1990).

A raça lanada naturalizada brasileira que talvez se assemelhe mais com as raças dos países ibéricos seja a Crioula Lanada. Trazida de Portugal e Espanha pelos colonizadores, essa raça é encontrada no Sul do Brasil, como

também em quase todos os países sul-americanos. Acredita-se que possa ser originária da ovelha Churra espanhola (Mariante & Cavalcante, 2000). Como toda raça naturalizada, apresenta maior precocidade, fertilidade e resistência a endoparasitas. Sua lã, apesar de ser considerada de qualidade inferior à de raças especializadas, é bastante utilizada em artesanato.

Em relação às raças exóticas ou recentemente introduzidas, serão comentadas, igualmente as raças naturalizadas, apenas os grupos que foram analisados neste trabalho. A raça Ile de France é originada da França, na região da bacia parisiense, denominada Ile-de-France. A partir de 1816 técnicos franceses iniciaram cruzamentos de ovelhas Merino Rambouillet com reprodutores New Leicester (Dishley) importados da Inglaterra. O objetivo era obter um ovino que reunisse a qualidade laneira do Merino com a aptidão de corte do New Leicester. Os cruzamentos foram coordenados por August Yvart, Inspetor Geral do Estado e professor da Escola Nacional de Veterinária de Alfort, daí a raça ser também conhecida inicialmente por raça de Alfort. Em 1875 participou da Exposição de Paris sob a denominação de Dishley-Merino. Em 1920, a raça recebeu uma infusão de sangue Merino Cotentin, com a finalidade de eliminar pigmentos escuros da pele do focinho. O Livro de Registros foi criado em 1922 de modo que a raça veio a receber a denominação definitiva em 23 de fevereiro de 1923, quando da fundação do Sindicato dos Criadores da Raça Ile-de-France, em consideração ao nome da região de origem. É um ovino de porte grande, constituição robusta e conformação harmoniosa, típica do animal produtor de carne. Atualmente é considerada uma raça de duplo propósito, com um equilíbrio zootécnico orientado de 60% para a produção de carne e 40% para a produção de lã. Segundo Giudice (2005) as primeiras importações da raça para a América do Sul ocorreram em 1924 e o primeiro animal registrado pela ARCO (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos) foi em 1972.

A raça Hampshire Down teve como berço os condados de Wilts, Hants e Dorset, no sul da Inglaterra. Os seus ancestrais eram ovinos primitivos que pertenciam a duas raças: Wiltshire e Berkshire Knots. Os Wiltshire eram grandes, com cara e patas sem lã e com chifres recurvados para trás, os Berkshire Knots possuíam a cara e as patas negras. Ambas apresentavam animais de corpo estreito, com pernas longas, prolíferos, rústicos, mas com pouca cobertura muscular. Procurando melhorar a aptidão de corte destes

ovinos, os criadores aperfeiçoaram o sistema de alimentação e iniciaram os cruzamentos com a raça Southdown, que foi introduzida nos rebanhos Wiltshire e Berkshire no início do século XIX. A partir de 1845 o conceito de precocidade, qualidade e engorda modificou o sistema de criação de maneira que foi possível fixar um tipo bastante uniforme mediante o emprego de consangüinidade. Em 1889 foi criada na Inglaterra a "Hampshire Down sheep breeders Association", com sede em Salisbury, e em 1890 editou-se o primeiro Livro de Registros do Hampshire Down. Ovino de tamanho grande, conformação harmoniosa e constituição robusta com nítida especialização para produção de carne.

A raça Corriedale é originada da Nova Zelândia entre os anos de 1880-1910 a partir dos cruzamentos de carneiros Lincoln ou Leicester Longwool com matrizes Merino. Esta raça se espalhou nas Américas durante o século passado de forma que formou grandes efetivos populacionais nesse continente, inclusive no Sul Brasil.

Sugere-se que a origem da raça Damara seja da Ásia Oriental e Egito e, posteriormente, foi introduzida para Angola e Namíbia. É encontrada, principalmente, no noroeste da Namíbia (Kaokoland) e ao sul de Angola onde foi mantida livre da influência de outras raças. O nome da raça é derivado da região onde originalmente foi encontrada (Gross Damaraland). Por sua semelhança morfológica, existem hipóteses que essa raça seja uma das fontes da raça Rabo Largo. Apresenta uma grande variedade de pelagem, porém todas aceitas. A pigmentação da pele é essencial e é o único requisito feito em relação à pelagem. Apresenta porte médio, com corpo longo e medianamente profundo. É muito rústica, sendo fértil mesmo em regiões edafoclimáticas desfavoráveis. Habilidade materna boa.

Os ovinos Dorper são originários da região Sul Africana desenvolvida nos anos 30 a partir de animais das raças Dorset e Blackheaded Persian (fonte da raça Somalis). Foi desenvolvida para regiões semi-áridas extensivas da África do Sul, a partir de cruzamentos de ovelhas Blackhead Persian com carneiros chifrudos Dorset, o que resultou em cordeiros Dorper brancos. A diferença de cor é simplesmente um fato de preferência de cada criador. Cerca de 85% dos membros da Associação Sul Africana de Criadores da raça Dorper criam animais de cabeça preta. Esta raça é numericamente a segunda maior na África do Sul e está difundida em muitos países ao redor do mundo. A raça apresenta animais tanto de cabeça negra (Dorper) como de cabeça branca

(White Dorper). É uma das mais férteis raças de ovinos sem cornos, com bom comprimento corporal e cobertura de pelos e lã claros e curtos. Apresenta excepcional adaptabilidade, robustez e excelentes taxas de reprodução e crescimento (cerca de 36kg - entre três meses e meio e quatro meses de idade), tanto quanto boa habilidade materna.

Para que ocorra uma mudança desse cenário da ovinocultura nacional, é necessária uma profunda modificação logística de todas as classes envolvidas na produção de ovinos, ou seja, desde o pesquisador até o produtor. Tal atitude é válida, visto que os ovinos representam, principalmente nas regiões Sul e Nordeste, uma fonte de recursos importante dos pontos de vista social, econômico, cultural e histórico. Desta forma, a caracterização das raças naturalizadas existentes, a relação genética entre elas, bem como o conhecimento de suas origens em outras raças são o passo inicial para obter subsídios para programas de melhoramento, manejo e conservação para as raças de ovinos naturalizados brasileiros.

Os programas de conservação podem ser enfocados sob vários níveis, desde ecossistemas e comunidades até indivíduos (Mace *et al.* 1996), bem como sob a ótica de várias estratégias e métodos. As técnicas moleculares têm auxiliado na compreensão das relações evolutivas, taxonomia e demografia de uma ampla diversidade de animais e plantas (Milligan *et al.*, 1994; Fritsch e Rieseberg, 1996; Mace *et al.*, 1996; Heithaus e Laushman, 1997; Haig, 1998).

Os marcadores moleculares RAPD-PCR – Random amplified polymorphic DNA - Polymerase chain reaction (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990), quando rigorosamente padronizados (Pérez *et al.*, 1998, Fritsch e Rieseberg, 1996), podem ser úteis em estudos de genética de populações, sistemática e ecologia de vários organismos (Hadrys *et al.*, 1992; Fritsch e Rieseberg, 1996, Hsiao e Liao, 1998, Bartish *et al.*, 1999, Lacerda *et al.*, 2001). Estes marcadores auxiliam no conhecimento dos padrões de variação genética inter e intrapopulacionais, permitindo a elaboração de medidas para conservação de espécies ameaçadas ou em perigo de extinção (Gibbs *et al.*, 1994; Haig *et al.*, 1996; Cardoso *et al.*, 1998, Apostolidis *et al.*, 2001). Contudo, praticamente não existem trabalhos de RAPD realizados com ovinos (Stephen *et al.*, 2000).

Outra categoria de marcadores são os marcadores microssatélites ou STR (Single Tandem Repeats), que ao contrário dos marcadores RAPD, apresentam natureza co-dominante, e ainda mantém alto polimorfismo e em geral, são neutros. Estes marcadores já foram usados em ovinos para diversos propósitos, desde análises de divergência genética de populações até testes de exclusão de paternidade e certificação racial (Arranz *et al.*, 1998; Díez-Tascón *et al.*, 2000; Ramey II *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2001).

Segundo Petit *et al.* (2002), fêmeas e machos apresentam papéis diferenciados na criação e manutenção da estrutura genética das populações, principalmente em decorrência dos sistemas de acasalamentos e padrões de dispersão. Dessa forma, uma estratégia molecular atualmente utilizada seria a identificação e análise da variabilidade das linhagens maternas e paternas das raças e/ou espécies. Vários trabalhos, principalmente em bovinos e humanos, utilizaram marcadores no cromossomo Y para restaurar a história evolutiva das linhagens paternas ao longo de grandes regiões geográficas (Hurles & Jobling, 2001; Edwards *et al.*, 2000; Hanotte *et al.*, 2000). Vários autores caracterizam as linhagens maternas por meio de marcadores nos genes mitocondriais (Avise 2000; Tarbelet, 1996; Avise 1994). Em relação aos ovinos, estudos independentes da região controle do mtDNA obtidos por Wood & Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998), demonstraram que o genoma mitocondrial de *Ovis aries* está dividido em dois grandes haplogrupos, um com origem europeia e outro provavelmente de origem asiática. Posteriormente, Hiendleder *et al.* (1999), desenvolveu um teste diagnóstico para diferenciar estes dois tipos de mtDNA a partir da técnica de RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism. Contudo, recentemente Guo *et al.* (2005) propuseram um terceiro haplogrupo para *Ovis aries* originado possivelmente na região da China.

Deste modo, o presente trabalho visa aumentar o conhecimento da variabilidade genética existente entre as principais raças de ovinos naturalizadas e comerciais brasileiras bem como investigar as possíveis origens destas. É importante ressaltar que tal estratégia é inédita e de ampla importância tanto para a conservação quanto para o melhoramento animal no Brasil.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Realizar um conjunto de técnicas moleculares que permitam a caracterização e a elaboração de programas estratégicos que visem à conservação da variabilidade genética das principais raças e ou dos estoques de ovinos naturalizados do Brasil.

Objetivos Específicos:

1. Caracterizar geneticamente cinco raças ou grupos de ovinos brasileiros por meio de marcadores RAPD-PCR;
2. Caracterizar geneticamente dez raças ou grupos de ovinos brasileiros por meio de marcadores microssatélites;
3. Estimar probabilidades para o cálculo de exclusão de paternidade e certificação racial para cada grupamento analisado a partir dos marcadores microssatélites;
4. Comparar as técnicas de RAPD-PCR e microssatélites para análises de variabilidade genética em raças e rebanhos de ovinos;
5. Estimar as relações filogenéticas entre as principais raças naturalizadas brasileiras por meio do seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial (mtDNA);
6. Estimar a frequência de um SNP (Single Nucleotide Polymorphism) no gene mitocondrial Citocromo Oxidase I do mtDNA em onze raças ou grupos de ovinos brasileiros;

7. Avaliar a origem da designação Santa Inês e verificar seu status de raça *sensu* Ministério da Agricultura;
8. Identificar a existência de polimorfismos no cromossomo Y nas raças ou grupos de ovinos brasileiros;
9. Propor soluções práticas para maximizar o manejo e conservação das raças de ovinos pertencentes a Núcleos de Conservação já instalados no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarante A.F.T., Bricarello P.A., Rocha R.A. *et al.* (2004). Resistance of Santa Inês, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. *Veterinary Parasitology* 120:91-106.
- Apostolidis A.P., Mamuiris Z., Karkavelia E., Alifakiotis T. (2001). Comparison of Greek breeds of horses using RAPD markers. *Journal of Animal Breeding Genetics* 118: 47-56.
- Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F. (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Animal Genetics* 29: 435-440.
- Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F. (2001). Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genetics Selection Evolution* 33: 529-542.
- Awise J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, Inc. 511p.
- Awise J.C. (2000). *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, Harvard. 447p.
- Bartish L.V., Jeppson N.E., Nybom, H. (1999). Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* 8: 791-802.
- Bricarello P.A., Gennari S.M., Oliveira-Sequeira T.C.G. *et al.* (2004). Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research* 51:75-83.
- Cardoso M.A., Provan J., Powell W., Ferreira P.C.G., De Oliveira D.E. (1998). High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Molecular Ecology* 7:601-608.
- Domingues O. (1941). Carneiro deslanado de Morada Nova. *Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia*, v.4 (1), p.122.
- Domingues O. (1954). Sobre a origem do Carneiro Deslanado de Morada Nova. *Seção de Fomento Agrícola*, n.3, Fortaleza, Ceará, 24p.
- Diez-Tascon C., Littlejohn R.P., Almeida P.A.R., Crawford A.M. (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics* 31:243–251.
- Edwards C.J., Gaillard C., Bradley D.G., MacHugh D.E. (2000). Y –Specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Animal Genetics* 31:127-130.
- FAO (1995). Segundo documento de líneas directrices para la elaboración de planes nacionales de gestión de los recursos genéticos de animales de granja. Medida de la diversidad de los animales domésticos (MoDAD): Marcadores microsatélites recomendados. MoDAD- FAO. Disponível em <http://dad.fao.org>

- FAO. (2001). In: DAD-IS 2. Domestic Animal Diversity Information System. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <http://dad.fao.org>
- Figueiredo E.A.P., Shelton M. & Barbieri M.E. (1990). Available genetic resources: the origin and classification of the world's sheep. In : Hair Sheep Production in Tropical and Subtropical Regions, Davis, USA, pp. 25-36.
- Fritsch P., Rieseberg L.H. (1996). The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Molecular Genetic Approaches in Conservation. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.54-73. Oxford Press University, New York.
- Gibbs H.L., Prior K.A., Weatherhead P.J. (1994). Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:329-337.
- Giudice J.C. (2005). A raça ovina Ile de rance no Brasil. Disponível em <http://www.iledefrance.org.br>, acessado em dezembro de 2005.
- Guo J., Du L.-X., Ma Y.-H., Guan W.-J., Li H.-B., Zhao Q.-J., Li X., Rao S.-Q. (2005). A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics* 36: 331-336.
- Haig S.M., Bowman R., Mullins T.D. (1996). Population structure of Red-cockaded Woodpeckers in south Florida: RAPDs revisited. *Molecular Ecology* 5: 725-734.
- Haig S.M. (1998). Molecular Contributions to Conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.
- Hanotte O., Tawah C.L., Bradley D.G., Okomo M., Verjee Y., Ochieng J., Rege J.E.O. (2000). Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan African cattle breeds. *Molecular Ecology* 9: 387–396.
- Heithaus M.R.; Laushman R.H. (1997). Genetic variation and conservation of stream fishes: influence of ecology, life history, and water quality. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 1822-1836.
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y. & Lewalski H. (1998). Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources. No evidence for contributions from Urial and Argali sheep. *Journal of Heredity* 89, 113-120.
- Hiendleder S., Phua S.H. & Hecht W. (1999). A diagnostic assay discriminating between two major *Ovis aries* mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 30, 211-213.
- Hsiao J.Y., Liao L.C. (1998). Relationship between population genetic structure and riparian habitat as revealed by RAPD analysis of the rheophyte *Acorus gramineus* Soloand. (Araceae) in Taiwan. *Molecular Ecology* 7, 1275-1281.

- Hurles M.E. & Jobling M.A. (2001). Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y. *Molecular Ecology* 10, 1599–1613.
- Lacerda D.R., Acedo M.D.P., Lemos Filho J.P. e Lovato M.B. (2001). Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymentia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology* 10, 1143-1152.
- Mace G.M., Smith T.B., Bruford M.W., Wayne R.K. (1996). An overview of the Issues. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.3-25. Oxford Press University, New York.
- Mariante A. da S. e Cavalcante N. (2000). *Animais do descobrimento: raças domésticas da História do Brasil*. Brasília: Embrapa Sede, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 232 p.
- Mariante A. da S., Albuquerque M. do S.M., Egito A.A. & McManus C. (1999). Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. *Animal Genetic Resources Information* 25, 109-123.
- Mason I.L. (1980). Strengthening agricultural research in Brazil. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, Sobral – CE, 30p.
- Mendes B.V. (1993). *Ovinos Somalis*. Coleção Mossoroense, série B, n.1235, ESAM-Mossoró, RN, 48p.
- Mendes B.V. (1996). *Carneiro do Deserto do Sudão*. Coleção Mossoroense, série B, n.1330, ESAM-Mossoró, RN, 22p.
- Milligan B.G., Leebens-Mack J., Strand A.E. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology* 3, 423-435.
- Minch E., Ruiz-Linares A., Goldstein D., Feldman M., Cavali-Sforza L.L. (1996). *Microsat (version 1.5)*.
- Miranda R.M. (1990). Avaliação da influência de fatores genéticos e de meio sobre a produtividade de ovinos no cerrado (continuação do projeto inicial). Project submitted to CNPq 1990.
- Morais O.R. (2000). O melhoramento genético dos ovinos no Brasil: situação atual e perspectivas para o futuro. In: *Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3ª*, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: FEPMVZ, 266-272.
- Morais O.R. (2001). O melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: *Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal* (ed. Pereira J.C.C.), 3ed., Belo Horizonte, FEPMUZ Editora, 555p.
- Moritz C. (1994). Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 373-375.
- Notter D.R. (1999). The importance of genetic Diversity in Livestock Populations of the Future. *J. Anim. Sci.* 77, 61-69.
- Pérez T., Albornoz J., Domínguez A. (1998). An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 7, 1347-1357.
- Petit E., Balloux F., Excoffier L. (2002). Mammalian population genetics: why not Y? *Trends in Ecology & Evolution* 17(1), 28-33.
- Pinheiro Jr., G. C. (1973). *Os ovinos no Brasil*. Belo Horizonte: Itatiaia, 224p.

- Ramey II R.R., Luikart G., Singer F.J. (2000). Genetic bottlenecks resulting from restoration efforts: the case of bighorn sheep in Badlands National Park. *Restoration Ecology* 8(45), 85-90.
- Stephen J., Kifaro G.C., Wollny C.B.A., Gwakisa, P.S. (2000). Molecular genetic variation among five local sheep ecotypes in Tanzania. Proceedings of the 27th TSAP Scientific Conference 2000, Tanzania. Disponível em <http://www.ihh.kvl.dk/html/php/Tsao00/Stephen.htm>
- Taberlet P. (1996). The use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.3-25. Oxford Press University, New York.
- Vieira G. V. N. (1956). *Criação de ovinos*. São Paulo: Ed. Melhoramentos, 371p.
- Welsh J., McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18,7213-7218.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Research* 18,6531-6535.
- Wood N.J. & Phua S.H. (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Animal Genetics* 27, 25-33.

CAPÍTULO 1

Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds¹

Samuel Rezende Paiva⁽¹⁾, Vanessa Chaves Silvério⁽²⁾, Andréa Alves Egito⁽¹⁾, Concepta McManus⁽²⁾, Danielle Assis de Faria⁽³⁾, Arthur da Silva Mariante⁽¹⁾, Sílvia Ribeiro Castro⁽¹⁾, Maria do Socorro Maués Albuquerque⁽¹⁾ and Jorge Abdala Dergam⁽⁴⁾

⁽¹⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900 Brasília, DF, Brazil. E-mail: samuel@cenargen.embrapa.br, vanessa@cenargen.embrapa.br, egito@cenargen.embrapa.br, mariante@cenargen.embrapa.br, silvia@cenargen.embrapa.br, maués@cenargen.embrapa.br ⁽²⁾Universidade de Brasília, Fac. de Agronomia e Veterinária, CEP 70910-900 Brasília, DF, Brazil. E-mail: concepta@unb.br ⁽³⁾Universidade Federal de Viçosa (UFV), Dep. de Zootecnia, CEP 36571-000 Viçosa, MG, Brazil. E-mail: danyaf@homenet.com.br ⁽⁴⁾UFV, Dep. de Biologia Animal, CEP 36571-000 Viçosa, MG, Brazil. E-mail: dergam@ufv.br

Abstract – The objectives of this work were to investigate the genetic structure of the Brazilian hair sheep breeds and to determine the origin of the Santa Inês breed. Molecular similarity was determined using Randomly Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction markers in 238 individuals from five naturalized sheep breeds: Santa Inês (48 animals), Rabo Largo (48), Somali (48), Morada Nova (48) and Bergamasca (46), collected in Goiás, Sergipe, Bahia, and Ceará States as well as in the Federal District. Fifty-four loci were selected from 19 primers, after a pilot test using 140 primers. Qualitative analyses indicate diagnostic markers for all breeds. All breeds were significantly different from each other. Interbreed differences were explained by 14.92% of the total variation. Santa Inês clustered with Bergamasca (97% bootstrap) and with Rabo Largo, composing the third member of the group (81% bootstrap) while Morada Nova and Somali breeds clustered separately. Each breed should be considered as a separate management and conservation unit, and special care should be taken with Rabo Largo, Morada Nova and Somali breeds, represented by small herds in Brazil.

Index terms: *Ovis aries*, conservation genetics, domestic animal diversity, molecular markers, RAPD.

Variabilidade genética de raças de ovelhas deslanadas do Brasil

Resumo – Os objetivos deste trabalho foram identificar a origem racial de ovinos Santa Inês e avaliar a unicidade das populações das principais raças naturalizadas brasileiras de ovinos deslanado. Foi realizado um estudo dos padrões de semelhança molecular a partir de marcadores RAPD-PCR, utilizando-se 238 indivíduos dos Estados de Goiás, Sergipe, Bahia, e Ceará assim como do Distrito Federal, distribuídos entre as raças Santa Inês (48 animais), Bergamácia (46), Rabo Largo (48), Morada Nova (48) e Somali (48). Após triagem com 140 primers, foram selecionados 54 locos a partir de 19 primers e todas as raças apresentaram marcadores específicos. Análises qualitativas mostraram a presença de marcadores diagnóstico-específicos para todas as raças. As diferenças inter-raciais foram significativas e responsáveis por 14,92% da variação total observada. Na análise de agrupamento, a raça Santa Inês ficou próxima à Bergamácia (com 97% de valor *bootstrap*). A raça Rabo Largo apresentou maior similaridade com este grupo (com 81% *bootstrap*) do que as raças Morada Nova e Somali. Cada raça deve ser considerada como unidade de conservação e manejo, especialmente as raças Rabo Largo, Morada Nova e Somali, as quais apresentam as menores populações no País.

Termos para indexação: *Ovis aries*, genética da conservação, diversidade de animais domésticos, marcadores moleculares, RAPD.

¹ Artigo Publicado na Revista Agropecuária Brasileira (PAB), v.40, n.9, p.887-893, set 2005.

Introduction

Sheep husbandry has been traditionally considered as of low commercial value in Brazil, and it is generally restricted to the informal economy. According to the Morais (2000), these practices determined that Brazilian sheep products such as wool, meat and hides, were uncompetitive compared to other countries, which invested in genetic improvement of production traits and conservation of national breeds. In the Northeast and Central West of Brazil, regions characterized by long dry periods, hair sheep breeds represent an important source of protein for local populations. More recently, in these regions, market diversification has increasingly considered sheep as a viable and lucrative option. However, efforts for closure of genealogical registers and crossbreeding actions have been hampered by the lack of data of the genetic structure of breeds.

The first strategic step is, therefore, to increase knowledge of existing genetic variability among the main breeds of Brazilian hair sheep, and to identify their breed origins. RAPD-PCR molecular markers – Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction (Williams *et al.*, 1990), when applied with criteria (Black, 1993), are used as a preliminary approach to identify possible patterns of inter- and intra-population genetic variation. This allows the application of conservation programs on threatened or endangered species (Cardoso *et al.*, 1998). Few RAPD studies are available on sheep populations (Kantenen *et al.*, 1995; Yuanfang *et al.*, 2002; Ali, 2003).

The objectives of this work were to characterize the genetic structure of five Brazilian hair sheep breeds using RAPD-PCR molecular markers and to determine the origin of Santa Inês breed.

Material and Methods

Sample collection and DNA extraction

Blood was collected from 238 individuals of Santa Inês, Morada Nova, Somali, Rabo Largo and Bergamasca breeds in Goiás, Sergipe, Bahia and Ceará States as well as in the Federal District. DNA was extracted from leucocytes using an inorganic protocol modified by Miller *et al.* (1988). After

extraction the DNA was diluted (3 ng/ μL), quantified by spectrophotometer and in agar gel at 1% and stored at -20°C until use.

RAPD-PCR Analysis

The PCR reactions were carried out in a MJ Research (PTC100) thermocycler using an amplification program with 40 cycles with the following stages: a) 15 sec at 94°C , b) 1 min at 35°C and c) 1 min at 72°C . At the end of the 40 cycles an additional stage of 7 min at 72°C was added for complete extension of amplified products. RAPD-PCR reactions were carried out in a final volume of 13 μL , with 20mM Tris-HCl (pH 8.4); 50mM KCl; 3.5mM MgCl_2 ; 200 μM of each dNTP; 8% BSA 2.5mg/mL; 0.4 μM of the arbitrary primer; 1.5 U Taq DNA polymerase (Phonutria Biotechnology & Services) and 9 ηg DNA.

A total of 140 decamer oligonucleotide primers (Operon Technologies Inc., Alameda, Calif., kits: A, B, J, K, N, S and AB) were screened using unique samples of DNA from distinct breeds. Primers were designated as useful if they yielded well-amplified, distinguishable polymorphic bands.

Data were recorded in a binary matrix (1 = presence of a band, 0 = absence). Before analyses were carried out, fragments with a frequency higher than:

$$1 - \left(\frac{3}{N} \right) \text{ (where N is the population sample),}$$

in each population were discarded, to obtain a less unbiased estimate of allele frequencies (Lynch & Milligan, 1994). Allelic frequency was estimated for the null allele (absence of fragment) using the formula proposed by Lynch & Milligan (1994) for unbiased samples:

$$\hat{q} = \hat{x}^{\frac{1}{2}} \left[1 - \frac{\frac{\hat{x}(1 - \hat{x})}{N}}{8\hat{x}^2} \right]^{-1},$$

where \hat{q} = estimated null allele frequency, \hat{x} = proportion of the N sampled individuals that do not exhibit the marker.

Within-breed gene diversity was estimated from expected heterozygosis (H) under Hardy-Weinberg equilibrium, and the proportion of polymorphic loci (P). Bands were screened as “diagnostic” when they were unique for some breeds, and as “characteristic” when they occurred in up to 5% of individuals of

other breeds. Genetic structure was estimated with Fisher's Exact Test (Raymond & Rousset, 1995) under null hypothesis of panmixis. Hierarchical analysis was conducted with AMOVA (Huff et al., 1993). Nei's distance (1972) with correction of Lynch and Milligan (1994) was used to determine among population and breed variability, which was depicted as a neighbor joining (NJ) phenogram and bootstrap analysis with 1000 repetitions.

Genetic similarity among all individuals was estimated using Jaccard's coefficient, and this used to calculate principal components. This analysis was used, as phenotypic data are complex for use in hierarchical grouping studies (De Queiroz & Good, 1997), because they do not allow over-laying of OTUs (operational taxonomic units).

Genetic variability within and between populations was estimated using TFPGA - Tools for Population Genetics Analysis (Miller, 1997), RAPDDIST (West & Black, 1998) and PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993). Analyses of molecular variance were carried out using Arlequin (Schneider et al., 2000), and NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) 2.0 (Exeter Software, Setauked, N.Y.) was used for principal component analysis.

Results and Discussion

Nineteen primers (OPA10, OPB11, OPB19, OPB20, OPK01, OPK02, OPN03, OPN05, OPN11, OPN15, OPN19, OPN20, OPS02, OPS04, OPS05, OPS10, OPS18, OPAB04, OPAB11, OPERON Technologies, Inc.) were selected for DNA amplifications from 238 individuals. Fifty-four bands (loci) represented by conspicuous and reproducible fragments were selected. The size of the bands varied from 339 to 2,536 base pairs.

Within each breed, calculations showed that Somali had lowest values and Rabo Largo had highest for expected heterozygosity (H) (Table 1), while Santa Inês showed highest proportion of polymorphic loci (P) levels. These values were higher within breeds than between breeds. Within population values for H and P were highest in Rabo Largo from EBDA and lowest in Somali and Bergamasca from Goiás. Considering that Bergamasca from Goiás was also the smallest analyzed group, sampling errors could not be discarded.

Table 1. Gene diversity (H) and percentage of polymorphic loci (P) at the population (H_{pop}, P_{pop}) and breed (H_{breed}, P_{breed}) level for the 238 Brazilian hair sheep individuals evaluated.

Population ⁽¹⁾	N ⁽²⁾	H _{pop}	P _{pop}	H _{breed}	P _{breed}
OSI CO	15	0.3639	92.59		
OSI SE	17	0.3799	90.74	0.3881	100
OSI EM	16	0.3592	87.04		
OB DF	33	0.3472	92.59		
OB GO	13	0.3735	85.20	0.3857	98.15
ORL EB	28	0.4000	96.30		
ORL JU	20	0.3771	94.44	0.4050	98.15
OMN VE	23	0.3848	90.74		
OMN BR	25	0.3530	88.89	0.3929	94.44
OS	48	0.3229	90.74	0.3229	90.74

⁽¹⁾OSI CO: Santa Inês of Central West. ⁽²⁾OSI SE: Santa Inês of Sergipe. ⁽³⁾OSI EM: Santa Inês of Embrapa Tabuleiros Costeiros. ⁽⁴⁾OB DF: Bergamasca of University of Brasília. ⁽⁵⁾OB GO: Bergamasca of Goiás. ⁽⁶⁾ORL EB: Rabo Largo of EBDA (Research Center of Bahia State). ⁽⁷⁾ORL JU: Rabo Largo of Juazeiro. ⁽⁸⁾OMN VE: Morada Nova of Red Line. ⁽⁹⁾OMN BR: Morada Nova of White Line. ⁽¹⁰⁾OS: Somali.

Qualitative analysis of band frequencies (Table 2) showed that Santa Inês and Morada Nova had diagnostic loci when compared to all other breeds, but not between each other. On the other hand, low H and P indices and high levels of differentiation that characterized Somali were independently confirmed by the presence of diagnostic and characteristic loci of other breeds, compared to Somali. These results indicate that, due to processes of genetic drift and endogamy, Somali has been affected by stochastic events. The presence of diagnostic and characteristic bands between breeds will be useful in breeding conditions and conservation programs in these animals, as they can be used for breed identification in practical situations, such as crossbreeding recommendations and recognition of hybrids.

All breeds were significantly different from each other at $p < 0.001$ (Fisher's Exact Test). This also held among all populations except for three combinations of Santa Inês [Santa Inês from Central West – Santa Inês from Sergipe ($p = 0.147$); Santa Inês from Central West – Santa Inês from Embrapa Tabuleiros Costeiros ($p = 0.032$); Santa Inês from Embrapa Tabuleiros Costeiros – Santa Inês from Sergipe ($p = 0.012$)]. Differences were not significant between Santa Inês from Sergipe and Rabo Largo from EBDA ($p = 0.081$). Santa Inês was the only breed without significant differences between subpopulations due to the

fact that at least some rams of the Central-West region are related to animals from Sergipe. The other two populations, Santa Inês from Sergipe and Santa Inês from Embrapa Tabuleiros Costeiros, are geographically closer and therefore more homogeneous. Additionally, crosses between Santa Inês and Suffolk have been carried out in the Northeast to improve rear-end conformation and these animals were registered as purebred Santa Inês. To test this hypothesis, codominant markers as well as Suffolk animals must be added in future analysis. Yuanfang *et al.* (2002) found that the genetic relationship between different indigenous and imported sheep breeds in China by RAPD markers was in accordance with their localities and breeding history, which indicated that the RAPD technique was sensitive to differentiate sheep breeds. Similarly, Ali (2003), studying four sheep breeds in Egypt, found more genetic similarity among indigenous breeds than commercial ones.

Table 2. Number of characteristic (up to 5% presence; above diagonal) and diagnostic (specific; below diagonal) loci between five Brazilian hair sheep breeds.

	Santa Inês (OSI)	Bergamasca (OB)	Rabo Largo (ORL)	Morada Nova (OMN)	Somali (OS)
OSI	---	2 OB	1 ORL		3 OSI
OB	1 OSI	---		1 OB	4 OB
ORL	1 OSI		---	1 ORL	4 ORL
OMN		1 OMN	1 OMN	---	3 OMN
OS	1 OSI	1 OS/ 2 OB	1 OS/ 2 ORL	2 OMN	---

Interbreed differences accounted for 14.92% of total variation ($p < 0.001$) (Table 3). Contrary to genetic variability levels detected in other naturalized Brazilian species, in which levels of 29.96% (Spritze *et al.*, 2003) to 25.28% (Serrano *et al.*, 2004) were found for cattle, 24.53% for horses (Fuck, 2002), and 21.21% for goats (Oliveira, 2003), data found indicate that sheep have lower molecular variance. This relatively low value shows a close relationship between naturalized Brazilian sheep breeds, which are due to random crossbreeding between breeds at some time in history, associated with genetic drift. These breeds are descendant from a few European or African breeds (Mason, 1980), with a common evolution history. Alternatively, low levels of genetic variability, by these results, are indigenous to all sheep breeds

analyzed. Kantenen *et al.* (1995), using RAPD markers, also found low genetic variability between two sheep breeds in Finland. Nevertheless, using data obtained from the mitochondrial DNA control region (mtDNA) from various breeds of short and fattailed European sheep, Tapio & Grigaliunaite (2002) observed a higher level (27.84%) of inter-breed differences.

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) for 238 individuals sampled from five Brazilian hair sheep breeds.

Source of variation	Df ⁽¹⁾	SS ⁽²⁾	VC ⁽³⁾	% Total	P-value
Between breeds	4	349.381	1.63875	14.92	< 0.01
Within breeds	233	2177.65	9.34615	85.08	< 0.01
2					
Between breeds	4	349.381	1.04837	9.54	< 0.01
Between populations within breeds	5	144.276	1.01820	9.27	< 0.01
Within populations	228	2033.37	8.91832	81.19	< 0.01
7					

⁽¹⁾ Degrees of freedom (df); ⁽²⁾ Sum of Squares (SS); ⁽³⁾ Variance components (CV).

Evidence shows a significant genetic structure of populations within breeds (Table 3), as the difference between populations of the same breed (9.27%, $p < 0.01$) was similar to the variation between breeds (9.54%, $p < 0.01$). This result shows a low migration rate or exchange of animals between herds of the same breed. On the other hand, these results are important for management of these breeds, as the populations of the Morada Nova, Bergamasca and Rabo Largo behave as if they were independent management units.

The percentage of variation between the five breeds studied (Table 4), as well as between the ten populations of these breeds (Table 5), shows that the Rabo Largo is closer to the Santa Inês than to Morada Nova. The results also imply that Santa Inês resulted from a cross between wool and hair breeds, as it is close to both types of sheep included in the study. According to Morais (2001), the Santa Inês is a breed originated from crosses of Bergamasca with Morada Nova and Criollo sheep. The introduction of Bergamasca into Brazil occurred at the beginning of the 20th century (Boletim Pecuário, 2004), and it was also the only wool breed used in the study. More wool breeds need to be included, as well as more molecular markers and animals to test the effects of

sampling errors and bias estimations on the results. Among all breeds, Somali showed highest level of differentiation.

Table 4. Percentage difference between five Brazilian hair sheep breeds studied estimated by AMOVA (Analysis of Molecular Variance).

	Santa Inês (OSI)	Bergamasca (OB)	Rabo Largo (ORL)	Morada Nova (OMN)	Somali (OS)
OB	6.82	---			
ORL	5.93	11.08	---		
OMN	10.47	14.40	5.12	---	
OS	22.44	28.32	22.83	18.93	---

Table 5. Percentage difference between populations from five Brazilian hair sheep breeds studied estimated by AMOVA (Analysis of Molecular Variance).

	OSI CO ⁽¹⁾	OSI SE	OSI EM	OB DF	OB GO	ORL EB	ORL JU	OMN VE	OMN BR
OSI SE ⁽²⁾	6.24	---	-	-	-	-	-	-	-
OSI EM ⁽³⁾	7.20	7.37	---	-	-	-	-	-	-
OB DF ⁽⁴⁾	10.48	11.73	12.60	---	-	-	-	-	-
OB GO ⁽⁵⁾	17.58	12.31	12.93	15.02	---	-	-	-	-
ORL EB ⁽⁶⁾	9.48	3.51	6.87	12.03	13.87	---	-	-	-
ORL JU ⁽⁷⁾	15.07	13.84	10.78	17.18	23.32	5.73	---	-	-
OMN VE ⁽⁸⁾	18.53	11.77	16.53	19.65	20.67	7.32	8.98	---	-
OMN BR ⁽⁹⁾	17.48	12.33	19.73	21.71	19.33	7.94	16.80	13.58	---
OS ⁽¹⁰⁾	23.10	22.70	30.58	31.32	31.00	22.20	28.90	25.93	19.61

⁽¹⁾OSI CO: Santa Inês of Central West. ⁽²⁾OSI SE: Santa Inês of Sergipe. ⁽³⁾OSI EM: Santa Inês of Embrapa Tabuleiros Costeiros. ⁽⁴⁾OB DF: Bergamasca of University of Brasília. ⁽⁵⁾OB GO: Bergamasca of Goiás. ⁽⁶⁾ORL EB: Rabo Largo of EBDA (Research Center of Bahia State). ⁽⁷⁾ORL JU: Rabo Largo of Juazeiro. ⁽⁸⁾OMN VE: Morada Nova of Red Line. ⁽⁹⁾OMN BR: Morada Nova of White Line. ⁽¹⁰⁾OS: Somali.

In some cases, the variation among populations within the same breed was higher than that with the population of another breed. Bergamasca from Goiás was closer to Santa Inês from Sergipe, Santa Inês Embrapa Tabuleiros Costeiros and Rabo Largo from EBDA than the Bergamasca from Universidade de Brasília. Rabo Largo from EBDA was also closer to Santa Inês from Sergipe than to Rabo Largo from Juazeiro. Once again the Somali breed was placed apart from all other populations.

The phenetic dendrogram in Figure 1A is consistent with data in Table 4, showing greater proximity of Santa Inês to Bergamasca (with 97% of bootstrap

support), as well as greater proximity of Rabo Largo to the former instead of Morada Nova (81% bootstrap). The dendrogram in Figure 1B shows that there is one group formed by the Santa Inês and Bergamasca populations and other by the remaining hair sheep. It is also evident that Santa Inês has a mixed origin from both wool and hair sheep, reflected on the intermediate position of Santa Inês from Sergipe between the two main groups (Figure 1B and Table 5). In contrast, few clusters showed high bootstrap support in Figure 1B. This indicates that RAPD markers were unsuitable for resolving the relationships between populations of some breeds, but it shows that there was low genetic divergence between breeds. These results are corroborated by those in Table 5. Another explanation is the high rate of absorbent crosses carried out by sheep breeders who, looking for fast profits, use crossbreeding with wool meat breeds without maintaining stocks of purebred naturalized breeds.

Principal component analysis tested the consistency of results shown in the dendrograms (Figure 2). The first three principal components explain 56.47% of the total variation between animals. The first component shows a separation of some Bergamasca animals from the rest, while the second sets the Bergamasca animals apart from the Somalis. Bergamasca and Rabo Largo animals were found to overlies the Santa Inês, instead of the Morada Nova and Somali, as expected from historical information (Morais, 2001). Here the Somali were separated from the rest, as in the earlier analyses. A degree of overlap of individuals from the different breeds was also observed, confirming earlier results of high miscegenation levels, obtained using AMOVA (Tables 4 and 5) and the dendrograms (Figure 1), or, conversely, low genetic distance between breeds.

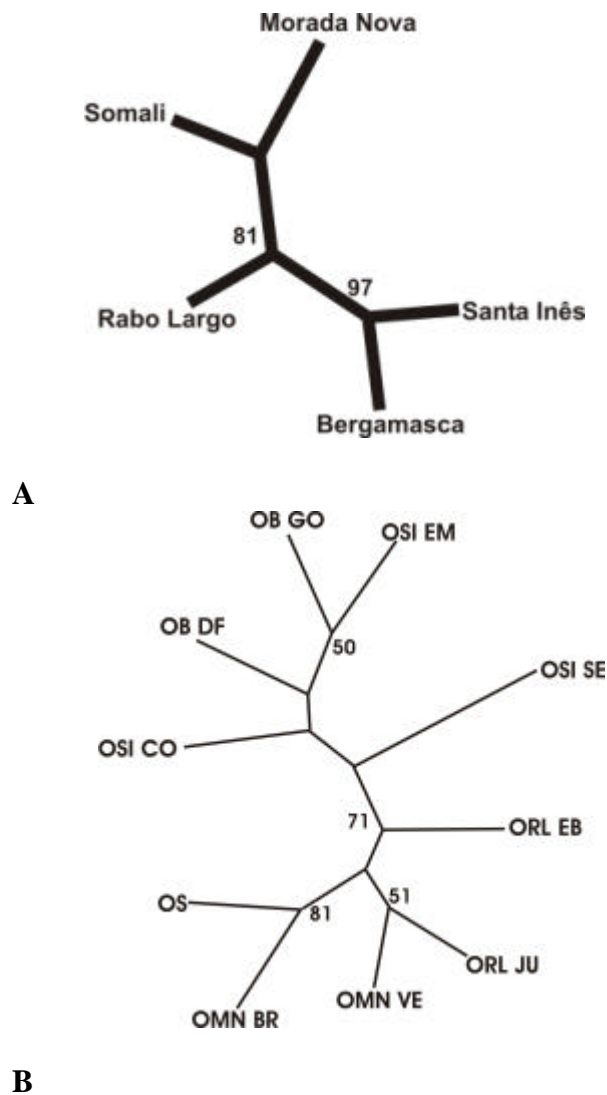


Figure 1. Dendrogram generated from Nei's distance and Neighbor-joining grouping showing relationships between breeds (A) and populations (B) of Brazilian hair sheep. Only Bootstrap values > 50% are shown. OSI CO: Santa Inês of Central West; OSI SE: Santa Inês of Sergipe; OSI EM: Santa Inês of Embrapa Tabuleiros Costeiros; OB DF: Bergamasca of University of Brasília; OB GO: Bergamasca of Goiás; ORL EB: Rabo Largo of EBDA; ORL JU: Rabo Largo of Juazeiro; OMN VE: Morada Nova of Red Line; OMN BR: Morada Nova of White Line; OS: Somali.

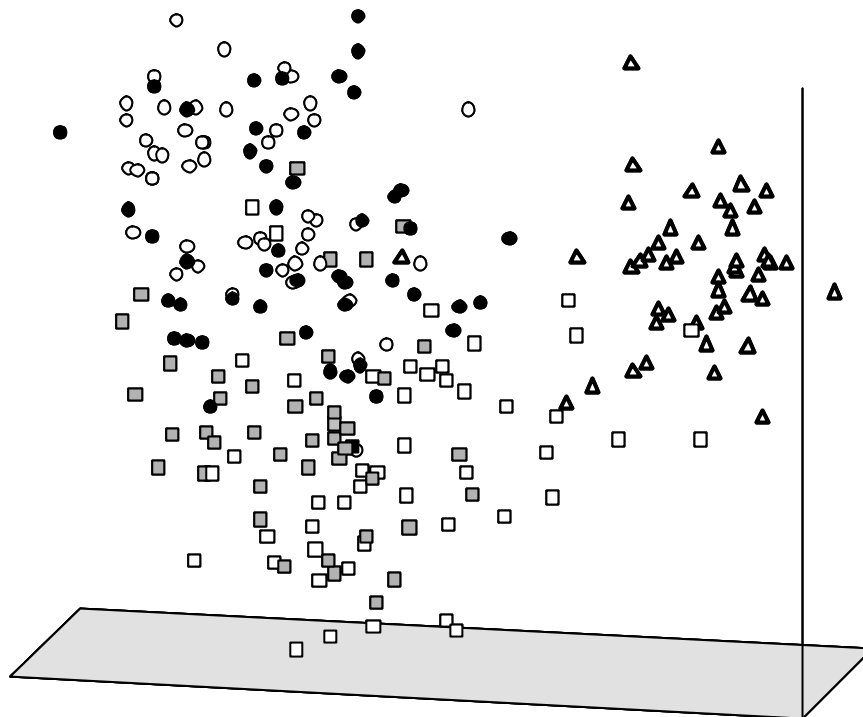


Figure 2. Principal component plot of the 238 individuals of *Ovis aries* obtained by Jaccard's coefficient. ●Santa Inês; ○Bergamasca; ■Rabo Largo; □Morada Nova; △Somali.

Conclusions

- 1) All five breeds studied are significantly different from each other, although genetic variation is low;
- 2) The Santa Inês is the result of crosses between wool and hair breeds;
- 3) Because they have smaller herds and significant genetic variability the Somali, Rabo Largo and Morada Nova breeds should be included in the Program for Conservation of Animal Genetic Resources of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Acknowledgements

EMBRAPA and FINATEC for financial support and Gilberto Leite, Hymerson Azevedo, Arturo Selaive-Villaroel, Robespierre Soares, Ana Luisa Aragão and Gisele Oliveira for collecting some samples.

References

- ALI, B.A. Genetics similarity among four breeds of sheep in Egypt detected by random amplified polymorphic DNA markers. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.7, p.194-197, 2003.
- BLACK, IV W.C. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Insect Molecular Biology**, v.2, p.1-6, 1993.
- BOLETIM PECUÁRIO. Brazilian Breeds Encyclopedia. Disponível em:< www.boletimpecuario.com.br>. Acesso em: 23 jan. /2004.
- CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; DE OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v.7, p.601-608, 1998.
- DE QUEIROZ, K.; GOOD, D.A. Phenetic clustering in biology: a critique. **The Quartely Review of Biology**, v.72, n.1, p.4-30, 1997.
- FELSENSTEIN, J. **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package) V. 3.5c. Seattle: Department of Genetics, The University of Washington, 1993. 51p.
- FUCK, B. Caracterização genética do cavalo Pantaneiro: uma contribuição para conservação da raça. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Brasília, 2002. 64p.
- HUFF, D.R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, p.927-934, 1993.
- KANTANEN, J.; VILKKI, J.; ELO, K.; MAKI-TANILA, A. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation. **Animal Genetics**, v.26, p.315-320, 1995.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD makers. **Molecular Ecology**, v.3, p.91-99, 1994.
- MASON I.L. **Prolific Tropical sheep**. FAO Animal Production and health paper n.17, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, Ed. FAO and UNEP, 1980, 124p.
- MILLER, M.P. **Tools for population genetics analyses (TFPGA)**: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Disponível em: < <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm> >.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.1215, 1988.
- MORAIS, O.R. O melhoramento genético dos ovinos no Brasil: situação atual e perspectivas para o futuro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL. Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte: FEPMVZ**, 2000, p.266-272.
- MORAIS, O.R. O melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: PEREIRA, J.C.C.(Ed.). **Melhoramento genético aplicado à produção animal**, 3ed.; Belo Horizonte, Editora FEPMUZ, 2001, p.320-330.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v.6, p.283-292, 1972.

- OLIVEIRA, R.R. **Caracterização genética de populações de caprinos da raça Moxotó usando marcadores moleculares**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2003. 59p.
- RAYMOND, M.L.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v.49, p.1280-1283, 1995.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**, ver.2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000. 111p.
- SERRANO, G.M.S.; EGITO, A.A.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A.S. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.6, p.543-549, jun. 2004.
- SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C. Genetic characterization of Criollo Lageano cattle using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1157-1164, out. 2003.
- TAPIO, M.; GRIGALIUNAITE, I. Is there a role for mitochondrial inheritance in sheep breeding? **Veterinarija ir Zootechnika**, v.18, n.40, p.108-111, 2002.
- WEST, D.; BLACK IV, W.C. Breeding structure of three species of Snow Pool *Aedes* mosquito species in northern Colorado. **Heredity**, v.81, p.371-380, 1998.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- YUANFANG, G.; XIANGLONG, L.; ZHENGZHU, L.; JINQUAN, L. Studies of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of main indigenous sheep breeds in China. **Hereditas**, Beijing, v.24, p.423-426, 2002.

CAPÍTULO 2

Diversidade genética e estrutura de populações das principais raças locais de *Ovis aries* no Brasil por meio de marcadores microssatélites

Resumo

O objetivo neste trabalho foi analisar a diversidade genética e estrutura de populações de dez raças (N=332) de ovinos no Brasil a partir do uso de 19 locos de microssatélites. Os resultados obtidos mostraram que 11,76% da variação total ($p < 0,001$) foram em razão de diferenças inter-raciais. O dendrograma obtido pela distância de Nei e algoritmo *Neighbor-joining* separaram as raças em três grupos principais. O primeiro formado por todas as raças naturalizadas brasileiras, a exceção da raça Somalis Brasileira. O segundo grupo foi composto pelas raças lanadas exóticas e o último grupo por duas raças africanas recém introduzidas no Brasil. A análise da variabilidade intra-racial demonstrou que a Santa Inês apresentou maiores valores de diversidade, enquanto que as raças Somalis e Corriedale apresentaram os menores valores. Todas as raças apresentaram valores de consangüinidade (F_{IS}) menores do que 8%. A partir de uma análise bayesiana foi possível identificar sub-estruturação significativa dentro das raças Santa Inês e Morada Nova. Esses resultados permitiram aumentar o conhecimento significativo acerca da distribuição da variabilidade genética de ovelhas no Brasil de maneira que podem ser aplicados no melhoramento e conservação das raças e rebanhos.

1. Introdução

O isolamento geográfico ao longo do tempo, associado aos efetivos populacionais pouco numerosos e as seleções natural e artificial, contribuiu para que se formasse uma grande variedade de tipos genéticos dentro de uma espécie e até mesmo dentro de uma raça de animal doméstico. Esse padrão é ainda mais complexo quando vários eventos de cruzamentos interespecíficos ou inter-raciais ocorreram ao longo do tempo evolutivo de um determinado grupo (Hall e Bradley, 1995; Bruford *et al.*, 2003). A raça é a unidade fundamental dos recursos genéticos de animais domésticos (Domingues, 1968, Hall e Bradley, 1995), seja para conservação, produção ou melhoramento. No entanto, para que essa unidade seja corretamente utilizada em cada uma das áreas citadas é necessário, inicialmente, um amplo conhecimento de vários aspectos biológicos, demográficos e, até mesmo, culturais dos locais onde estas populações estão inseridas. Em vista disso, a caracterização dos recursos genéticos animais para a FAO (*Food and Agriculture Organization*), pode ser considerado, de maneira geral, como todas as atividades que descrevem de alguma forma estes recursos e o ambiente nos quais os mesmos estão inseridos (Hamond, 1996).

Em relação específica a caracterização genética racial, pode-se dizer que ela é um critério adicional dentre vários outros para, por exemplo, priorizar as raças que devem ser incluídas em um programa de conservação (Eding e Laval, 1998). Dentre os vários marcadores que foram ou são utilizados para caracterização de raças destacam-se os marcadores bioquímicos (aloenzimas e tipos sanguíneos) e moleculares (DNA e RNA). Atualmente, as técnicas de genética molecular baseada no DNA são as mais utilizadas para caracterização genética das raças (FAO 1993, 2003). Com essas metodologias se espera principalmente: 1) aumentar o conhecimento da estrutura de populações existente por meio da quantificação das variabilidades genéticas intra e inter-raciais; 2) identificar, nestas espécies, regiões discretas do genoma associadas a características quantitativas, especialmente, de interesse econômico.

Dentre os marcadores baseados em polimorfismos do DNA, os locos de microssatélites são os mais utilizados atualmente para os estudos de diversidade genética e estrutura das populações em animais domésticos (Baumung *et al.*, 2004). Microssatélites são seqüências genômicas curtas

repetidas em tandem que geralmente ocorrem em regiões não codificantes e, presumivelmente, neutras. A unidade de repetição pode ser de dois a seis nucleotídeos de forma que as repetições de dinucleotídeos são as mais comumente encontradas. As principais características que fizeram esses marcadores uma grande ferramenta para análise genômica são sua abundância ao longo dos genomas, sua herança mendeliana e codominante e seu alto grau de polimorfismo. Adicionalmente, os microssatélites podem ser facilmente amplificados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de vários tipos de tecidos e, com a atual tecnologia para tipagem dos locos, é possível a análise de uma grande quantidade de indivíduos em um curto período de tempo (Luikart *et al.*, 1999).

Um exemplo clássico de análise de populações por marcadores microssatélites foi o trabalho de MacHugh *et al.* (1994), que a partir de 12 locos, estimaram as relações genéticas entre seis raças européias de bovinos. O resultado mais significativo foi que o dendrograma obtido com estes marcadores foi compatível com a geografia e as histórias de formação de cada raça. Em relação a eventos históricos, a descoberta atual mais interessante foi à observação de que todas as principais espécies de animais domésticos (bovinos, suínos, caprinos, ovinos) tiveram pelo menos, dois eventos de domesticação separados (Bruford *et al.*, 2003), um que ocorreu na Europa e outro na Ásia.

Em ovinos, os marcadores microssatélites têm sido largamente utilizados, especialmente nos últimos anos, para estudos de variabilidade genética (Arranz *et al.*, 2001, Gutierrez-Espeleta *et al.*, 2000), estrutura de populações (Tapio *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2004; Pariset *et al.*, 2003; Tapio *et al.*, 2003), certificação racial (Farid *et al.*, 2000) e exclusão de paternidade.

Entretanto, como qualquer técnica de biologia molecular, os microssatélites possuem algumas desvantagens. Uma primeira desvantagem é a dificuldade de isolamento desse tipo de marcador em alguns grupos taxonômicos em razão do baixo conhecimento de seus genomas (Beaumont & Bruford, 1999). Outra questão diz respeito aos erros de tipagens gerados por amostras que geram um DNA em pequena quantidade e de baixíssima qualidade como, por exemplo, o extraído de fezes, pelos e saliva (Bonin *et al.*, 2004). Um problema relativamente comum nos marcadores microssatélites é a presença de alelos nulos, que são amplificações parciais de um determinado

loco causado por mutações ou alterações na seqüência de anelamento de um dos *primers*. Tal acontecimento tende a aumentar o número de homozigotos na amostra e pode levar a conclusões erradas acerca do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação entre locos e até mesmo a erros de exclusão de paternidade. Recentemente, Peter *et al.* (2005) confirmaram um alelo nulo existente para o loco OarAE129, recomendado pela FAO para a análise de diversidade genética da espécie ovina *Ovis aries*, e propuseram a adoção de um novo par de alelos para a tipagem desse locus em estudos futuros.

Atualmente os recursos genéticos nativos de ovinos representam uma grande fonte de renda e um grande valor cultural para muitos países, principalmente para os membros da Comunidade Européia. Nestes foi iniciado um grande projeto de caracterização sócio-econômica e genética das principais raças de caprinos e ovinos de modo que os resultados obtidos ofereçam uma visão holística dos recursos existentes bem como seu uso potencial e sua viabilidade econômica nos mais diversos sistemas de produção (Marsan, 2005). Entretanto, a realidade na América do Sul é extremamente diferente, onde poucos recursos genéticos locais de ovinos são conhecidos e caracterizados. No continente, o Brasil possui a maior quantidade de raças deslanadas de ovinos locais, que por sua vez exercem um papel muito importante especialmente para os produtores da região Nordeste. A ovinocultura no Brasil é um grande potencial a ser explorado e que pode ser muito melhor aproveitado se forem realizados trabalhos de caracterização e conscientização da população acerca das raças naturalizadas.

Deste modo, o objetivo do trabalho foi analisar a diversidade genética e estrutura de populações das principais raças de ovinos naturalizados do Brasil. Esta análise foi conduzida por meio de marcadores microssatélites e possibilitou investigar a distribuição da variabilidade genética existente entre e dentro das raças, bem como testar a homogeneidade entre rebanhos de uma mesma raça. Os resultados desta investigação serão de grande importância para subsidiar, inicialmente, programas de conservação e, posteriormente, programas de melhoramento.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem e Extração do DNA

Todas as amostras analisadas com os marcadores RAPD no Capítulo 1 foram re-utilizadas para os marcadores microssatélites. Em razão das hipóteses geradas no capítulo anterior, como por exemplo, que raças auxiliaram a formação do grupo Santa Inês, foram coletadas mais amostras de Santa Inês bem como raças exóticas lanadas (Corriedale, Hampshire Down, Ile de France). Adicionalmente, foram incluídas duas raças da África do Sul, Dorper e Damara, introduzidas no Brasil recentemente. Dessa forma, foi utilizado um total de 383 indivíduos que compreenderam 10 raças (Tabela 1). Com exceção das amostras de Santa Inês do Ceará e Maranhão, todas as demais amostras são de animais registrados pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Dessa forma, é esperado, em teoria, que as amostras sejam representativas de cada raça.

Tabela 1 - Raças de ovinos utilizadas nas análises de microssatélites, localidades amostradas, suas respectivas siglas e número de animais por localidade.

Raça	Localidade	Sigla	N
Santa Inês	Fazendas, DF, GO	OSICO	15
	Fazendas, SE	OSISE	17
	Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE	OSIEM	16
	Fazenda, MA	OSIMA	21
	Fazenda, CE	OSICE	25
Bergamácia Brasileira	Universidade Brasília ¹ , DF	OBDF	33
	Fazendas, GO	OBGO	13
Rabo Largo	Empresa Estadual Pesquisa Agropecuária Bahia, BA	ORLEB	28
	Fazenda, BA	ORLBA	20
Morada Nova	Embrapa Caprinos, CE ²	OMNVE	23
	Universidade Federal Ceará, CE ³	OMNBR	25
Somalis Brasileira	Embrapa Caprinos, CE	OS	48
Hampshire	Fazendas, SP	OH	24
Ile de France	Fazendas, SP	OIF	24
Corriedale	Fazendas, SP	OC	11
Damara	Empresa Estadual Pesquisa Agropecuária Paraíba, PB	ODO	10
Dorper	Empresa Estadual Pesquisa Agropecuária Paraíba, PB	ODA	30
TOTAL			383

¹Animais com origem de RJ, SP e BA; ²Variedade Vermelha; ³ Variedade Branca

Todas as amostras usadas nesse trabalho foram de sangue e coletadas em tubos do tipo Vacutainer® contendo solução de EDTA 0,05 M para evitar

coagulação do material. O DNA foi extraído a partir de modificações de um protocolo não orgânico, a partir de NaCl saturado, proposto por Miller *et al.* (1988).

Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotômetro e por comparação em géis de agarose a 1% corados com brometo de etídio. Para referenciar as quantificações nos géis de agarose foram utilizadas várias diluições do DNA do bacteriófago *lambda* (Invitrogen). Uma vez quantificada, uma alíquota do DNA de cada amostra foi estocada à -80° C no Banco de DNA do Laboratório de Genética Animal (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF), enquanto outra alíquota foi diluída para 3 ng/ µl e estocada a -20° C até o momento de ser utilizada nas reações de PCR (Polymerase Chain Reaction).

2.2. Reações de PCR e tipagem dos locos de microssatélites

Para as reações de PCR, foram selecionadas e otimizadas as condições de amplificação de 22 locos de microssatélites: *OarFCB20*, *ILSTS05*, *OarFCB48*, *ILSTS11*, *ILSTS87*, *INRA35*, *INRA05*, *INRA63*, *OarAE129*, *OarFCB304*, *OMHC1*, *OarHH35*, *OarJMP29*, *INRA23*, *MAF65*, *MAF214*, *BM827*, *HUJ616*, *OarCP20*, *INRABERN172*, *SRCSP05*, *BM6526* (Tabela 2). Os dois principais critérios para a escolha destes locos foram: 1) Disponibilidade prévia nos Laboratórios de Genética Animal e de Biotecnologia Animal (Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia) e; 2) Estarem presentes na lista de recomendação da FAO (*Food and Agriculture Organization*) e ISAG (*International Society of Animal Genetics*) (FAO, 2004).

As reações de PCR foram realizadas separadamente para cada loco em volumes de 20 µl por reação, contendo: 2,5 mM dNTPs; Tampão 10X Tris-HCl/KCl (Invitrogen®); 1,0– 2,0 mM MgCl₂ (Invitrogen®); 1,25 µM de cada *primer*; 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Phoneutria®); água deionizada e 3 µl DNA extraído (3 ng/µl). A quantidade de água deionizada variou de acordo com a concentração de cloreto de magnésio utilizada. Em cada reação foram colocados controles negativos (sem DNA) para monitorar contaminações. As amplificações foram realizadas em quatro termocicladores distintos (Eppendorf Master Cycle Gradient, Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700, MWG e MJ Research - PTC100) a partir da seguinte rotina: 1) Desnaturação inicial a 94°C

por cinco minutos; 32-40 ciclos que compreenderam uma 2) desnaturação a 94°C por 30 segundos; 3) anelamento dos *primers* por um minuto a temperaturas que variaram de 42-62°C de acordo com o loco analisado; e 4) extensão das fitas a 72°C por um minuto. Uma etapa de extensão final a 72°C por 30 minutos foi acrescentada para diminuir a quantidade de fragmentos espúrios (“stutter bands”).

Todas as amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em géis de agarose 2,0% contendo o marcador 1kb Plus (Invitrogen®) para identificação dos fragmentos. As tipagens dos locos foram realizadas na Plataforma *ABI Prism 310* e analisadas a partir do software Genescan (Applied Biosystems®). Foi utilizado o padrão de tamanho molecular TAMRA 500 (Applied Biosystems) para estimar o tamanho dos alelos. Com o objetivo de otimizar o custo e a velocidade das tipagens no seqüenciador, vários locos foram tipados simultaneamente (*multiplex*) de acordo com a Tabela 2. Essas combinações foram estipuladas a partir da marcação fluorescente existente de cada loco bem como da variação alélica descrita na literatura (por ex., <http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm> Acessado em julho de 2005).

As etapas de extração e quantificação do DNA bem como as reações de PCR foram realizadas no Laboratório de Genética Animal localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/ DF. Enquanto que as tipagens no seqüenciador semi-automático foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal, localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Tabela 2. Cromossomo de origem (Cr.), seqüências dos *primers*, referências e parâmetros experimentais (temperatura de anelamento; concentração de cloreto de magnésio; número de ciclos no termociclador; variação de tamanho dos alelos; tipo de fluorescência existente em cada um dos locos e indicação dos locos que foram tipados simultaneamente no seqüenciador automático (Multiplex) para 22 marcadores de microssatélites usados nas raças de ovinos no Brasil.

Lócus	Cr.	Seqüência <i>primers</i> (5'-3')	Temp. (°C)	MgCl ₂ (mM)	Ciclos	Varição (pb)	Marcação*	Multiplex	Referência
INRA23	1	A) GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC B) TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	42	2,0	35	199-219	FAM	A	Vaiman <i>et al.</i> , (1994)
OarFCB20	2	A) AAATGTGTTTAAAGATTCCATACAGTG B) GGAAAACCCCATATATACCTATAC	59	1,5	35	88-118	TET	B	Buchanan <i>et al.</i> , (1993)
BM827	3	A) GGGCTGGTCGTATGCTGAG B) GTTGGACTTGCTGAAGTGACC	53	1,5	35	211-225	TET	C	Bishop <i>et al.</i> , (1994)
OarHH35	4	A) AATTGCATTCAGTATCTTTAACATCTGGC B) ATGAAAATATAAAGAGAATGAACCCACACGG	50	1,5	35	109-133	HEX	A	Henry <i>et al.</i> , (1993)
OarAE129*	5	A) AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG B)GTAGATCAAGATATAGAATATTTTTCAACACC	43	1,5	40	135-165	HEX	C	Penty <i>et al.</i> , (1993)
ILSTS87	6	A) AGCAGACATGATGACTCAGC B) CTGCCTCTTTCTTGAGAGC	50	1,5	35	143-169	FAM	B	Kemp <i>et al.</i> , (1995)
ILSTS05*	7	A) GGAAGCAATGAAATCTATAGCC B) TGTTCTGTGAGTTTGTAAAGC	52	1,5	35	181-201	TET	C	Brezinsky <i>et al.</i> , (1993)
ILSTS11*	9	A) GCTTGCTACATGGAAAGTGC B) CTAAAATGCAGAGCCCTACC	55	1,5	35	266-288	FAM	B	Brezinsky <i>et al.</i> , (1993b)
INRA05	10	A) CTTCAGGCATACCCTACACCACATG B) AAATATTAGCCAAGTAAAAGTGGG	62	1,5	32	114-152	FAM	C	Vaiman <i>et al.</i> , (1994b)
INRA35	12	A) ATCCTTTGCAGCCTCCACATTG B) TTGTGCTTTATGACACTATCCG	51	1,5	40	116-138	FAM	B	De Gotari <i>et al.</i> , (1997)
HUJ616*	13	A) TTCAAACACTACACATTGACAGGG B) GGACCTTTGGCAATGGAAGG	55	1,5	35	115-137	TET	C	Shalom <i>et al.</i> , (1993)

* Locos recomendados pela FAO/ISAG

Tabela 2. Continuação.

Locus	Cr.	Sequência primers (5'-3')	Temp. (°C)	MgCl ₂ (mM)	Ciclos	Varição (pb)	Marcação	Multiplex*	Referência
INRA63	14	A) ATTTGCACA AGCTAAATCTAACC B) AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	55	1,5	35	160-182	FAM	C	De Gotari et al., (1997)
MAF065*	15	A) AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG B) CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	59	2,0	35	121-139	HEX	B	Buchanan et al., (1991)
MAF214*	16	A) AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG B) GGGTGATCTTAGGGAGTTTTGGAGG	60	1,5	35	183-225	HEX	B	Buchanan e Crawford (1991)
OarFCB48	17	A) GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC B) GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	57	1,5	35	133-169	TET	B	Buchanan et al., (1993b)
SRCRSP5*	18	A) GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG B) TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	56	1,5	35	130-144	HEX	D	Maddox et al., (2000)
OarFCB304*	19	A) CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG B) CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	62	1,5	35	146-188	FAM	A	Buchanan e Crawford (1991)
OMHC1	20	A) ATCTGGTGGGCTACAGTCCATG B) GCAATGCTTTCTAAATTCTGAGGAA	55	1,0	40	180-210	FAM	A	Groth e Wetherall (1994)
OarCP20	21	A) GATCCCCTGGAGGAGGAAACGG B) GGCATTTTCATGGCTTTAGCAGG	63	3,0	35	64-86	HEX	E	Ede et al., (1995)
INRABERN172	22	A) CCACTTCCTGTATCCTCCT B) GGTGCTCCCATTGTGTAGAC	56	1,5	40	121-175	HEX	E	Saitbekova et al., 1999
OarJMP29*	24	A) GTATACACGTGGACACCGCTTTGTAC B) GAAGTGGCAAGATTCAGAGGGGAAG	51	1,5	35	110-154	TET	A	Broom et al., (1996)
BM6526	26	A) CATGCCAAACAATATCCAGC B) TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	55	2,0	40	147-167	TET	E	Bishop et al., (1994)

* Locos recomendados pela FAO/ISAG

2.3. Tabulação e análise estatística dos dados

Após as tipagens os resultados foram compatibilizados em uma planilha na qual cada linha representava um indivíduo e cada duas colunas representavam os alelos existentes para um determinado loco. Foram usados vários pacotes estatísticos, que serão citados, à medida que as análises sejam brevemente especificadas nos próximos tópicos. Dependendo das análises estatísticas realizadas as raças foram desmembradas em rebanhos de acordo com a Tabela 1 para verificar a influência dos mesmos na variação genética total bem como a existência ou não de estrutura de populações.

2.3.1. Variabilidade genética Intra-racial

A variabilidade intra-racial ou intrapopulacional foi quantificada a partir de estimativas de contagem direta das freqüências alélicas para cada loco utilizado. Os parâmetros genéticos populacionais mais utilizados para estimar essa a diversidade foram o número efetivo de alelos por loco, diversidade alélica, número de alelos diagnósticos (específicos) por raça, heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e o índice de fixação (Fis) ou coeficiente de consangüinidade.

A diversidade alélica ou número médio de alelos por loco foi estimado por contagem direta e divisão pelo total de locos utilizados. Como o número observado de alelos é extremamente ligado ao número de indivíduos analisados, foi estimado o número efetivo de alelos por loco em cada população analisada. Desse modo, diminui-se a influência do efeito amostral e dos alelos raros. O número efetivo de alelos foi estimado da seguinte forma:

$$n_e = 1 / \sum_u p_u^2, \text{ onde:}$$

p_u é a freqüência gênica de cada alelo presente em um loco e os valores são somados para todos os alelos (Frankham *et al.*, 2003).

A heterozigosidade observada para cada loco foi calculada a partir da equação:

$$H_o = \sum_{u \neq v} P_{uv}, \text{ onde:}$$

P_{uv} é a frequência de indivíduos que possuem genótipos com alelos distintos (heterozigotos). Já a heterozigosidade esperada sob EHW ou diversidade gênica foi estimada por:

$$H_e = 1 - \sum_{u=1}^k p_u^2, \text{ onde:}$$

k é o número de alelos e p_u é a frequência gênica de todos os alelos distintos presentes em um loco.

O cálculo do conteúdo de informação polimórfica (PIC) (Botstein *et al.*, 1980) é também estimado a partir do EHW e foi obtido para cada loco a partir da seguinte fórmula calculada pelo programa Cervus (Marshall, 1998):

$$PIC = 1 - \sum_{u=1}^k p_u^2 - \sum_{u=1}^{k-1} \sum_{v=u+1}^k 2 p_u^2 p_v^2, \text{ onde:}$$

O primeiro termo se refere a H_e e, o segundo, a somatória dos produtos de cada alelo existente para determinado locos. De outra forma, o PIC é nada mais do que a heterozigosidade esperada menos os indivíduos que, apesar de heterozigotos, são pouco informativos. Esse quadro é claramente observado quando existem poucos alelos com altas frequências.

O índice de fixação ou coeficiente de endogamia para cada população estudada (F_{is}) foi estimada a partir da equação utilizada por Nei (1987):

$$F_{is} = 1 - \left(\frac{H_o}{H_e} \right) \text{ onde, :}$$

H_o é a heterozigosidade observada em todos os locos tipados para uma determinada raça e H_e é a heterozigosidade esperada em cada raça para todos os locos analisados. As estimativas foram testadas a partir de valores de probabilidade gerados por aproximadamente 19.000 testes de permutação. Em razão de ser uma análise de testes múltiplos e com o intuito de reduzir o erro Tipo I, foi aplicado a Correção Seqüencial de Bonferroni para o valor de $\alpha=5\%$. Essas análises foram estimadas pelo software Fstat (Goudet, 2002).

Com o objetivo de auxiliar a seleção dos melhores locos para formação de um futuro painel de caracterização genética de ovinos brasileiros foram estimados, para cada um dos marcadores utilizados, os índices propostos por Weir e Cockerham (1984) análogos as estatísticas de Wright: F (F_{IT}), q (F_{ST}) e f (F_{IS}). Valores de *bootstrap* (Efron, 1985) foram obtidos para estimar intervalos de confiança a 95% de cada um dos índices. Esses parâmetros são relacionados pela seguinte expressão:

$$f = (F - q)/(1 - q)$$

2.3.2. Teste exato para desequilíbrio genotípico

O desequilíbrio gamético é a associação não ao acaso de alelos de diferentes locos nos gametas. O desequilíbrio de ligação pode ocorrer por vários fatores genéticos, desde a ligação física (no mesmo cromossomo), como por diferentes processos seletivos (por exemplo, seleção epistática e “carona” genética) e deriva genética em populações finitas. Bem como pode ocorrer por fatores demográficos como co-ancestralidade, migração e intercruzamento de populações.

O desequilíbrio gamético foi estimado para todas as possíveis combinações de locos (171) em cada população sob a hipótese nula “genótipos de um loco são independentes dos genótipos de outro loco”. Os testes também foram realizados globalmente considerando todas as populações um grupo apenas. Os testes foram realizados por meio do software Genepop (Raymond e Rousset, 1995) e o algoritmo usado foi baseado na análise de tabelas de contingências simples definidas entre os genótipos identificados entre dois locus. Cada tabela de contingência foi testada por meio do método de Cadeias de Markov com 1.200.000 iterações para criar as regiões de aceitação e rejeição da hipótese. Após as iterações os valores de probabilidade foram estimados a partir de um Teste Exato de Fisher.

2.3.3. Teste para existência de alelos nulos

Com o objetivo de identificar a existência de possíveis alelos nulos nos locos utilizados, foi estimada a probabilidade de ocorrência dos mesmos ao longo de todas as raças analisadas. Esse tipo de análise foi realizado com o software Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004), onde as freqüências observadas de homozigotos para cada locus/raça foram confrontadas com as freqüências de homozigotos simuladas pelo método de *bootstrap* (Efron, 1985).

2.3.4. Teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg

Uma população diplóide pode ser considerada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) quando suas frequências alélicas estão distribuídas ao acaso e não se alteram com o passar das gerações. Desvios do EHW podem ocorrer por vários fatores, de maneira que os principais são: 1) cruzamentos direcionados ou não ao acaso; 2) Subdivisão da população; 3) Coancestralidade; 4) Seleção; 5) Migração ou fluxo gênico; 6) Diferenças ligadas ao sexo; 7) Fatores temporais de amostragem; 8) Presença de alelos nulos; 8) erros de genotipagem dos locos analisados.

Para avaliar a existência de EHW dentro dos marcadores e populações analisadas de ovelhas foi aplicado o Teste U desenvolvido por Rousset e Raymond (1995) e calculado por meio do programa Genepop (Raymond e Rousset, 1995). A hipótese nula desse teste se baseia na união ao acaso dos gametas e suas hipóteses alternativas foram à existência ou de uma deficiência ou de um excesso de heterozigotos. Para estimar a região de aceitação e rejeição das hipóteses (valor p) o programa calculou uma estimativa não enviesada desse teste exato por meio do Método de cadeia de Markov e Monte Carlo por meio de 20.000 iterações como descrito no trabalho de Guo e Thompson (1992). Foram também realizados testes globais por raça e por locos para testar as hipóteses alternativas propostas. A única pressuposição para os testes globais é a independência entre os locos utilizados.

2.3.5. Variabilidade genética Inter-racial

Para testar as relações existentes entre as raças analisadas foram estimadas as distâncias genéticas por meio de cinco métodos baseados em diferentes pressuposições. Foram eles: 1) Índice de Fixação F_{ST} ou seu estimador θ proposto por Weir e Cockerham (1984), que é estimado apenas pela variância das frequências dos alelos observados; 2) Distância *Chord* (D_C) ou sem pressuposição biológica (distância geométrica), proposta por Cavalli-Sforza e Edwards, 1967); 3) Distância D_A (Nei *et al.*, 1983), distância geométrica muito semelhante a anterior que apenas apresenta uma correção para amostragens maiores, visto que o número de alelos raros aumenta com o número de indivíduos amostrados; 4) Índice R_{ST} (Slatkin, 1995), análogo ao F_{ST} , exceto que é estimado a partir da variância das diferenças entre os tamanhos dos alelos observados; 5) Distância D_{sw} (Shriver *et al.*, 1995), que é

uma extensão da distância mínima de Nei (1972) que utiliza, entretanto, a frequência absoluta da diferença entre número de repetições entre pares de alelos de microssatélites. As três primeiras distâncias, geralmente, se apresentam em conformação com o modelo de alelos infinitos (IAM) enquanto as duas últimas com o modelo mutação passo a passo (SMM). Da mesma forma, as duas últimas distâncias possuem pressuposições biológicas de equilíbrio entre deriva genética e mutação.

A correlação entre as diferentes matrizes obtidas por cada uma das distâncias genéticas acima foi realizada a partir de um Teste de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995) pelo software IBD (Bohonak, 2002). Adicionalmente, foi gerado um dendrograma a partir das distâncias genéticas DA de Nei (1983) e pelo método de *Neighbor-joining* por meio do software Dispan (Ota, 1993). Um teste de *bootstrap* com 1000 repetições foi também realizado para avaliar a consistência interna dos agrupamentos.

A análise de componentes principais foi realizada a partir de valores de F_{ST} estimados tanto entre os pares de cada raça como entre pares de todos os rebanhos contidos em cada raça avaliada. Valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 3000 repetições para testar a consistência dos componentes principais obtidos. Os resultados foram gerados a partir do software PCA (Goudet, 1999). Esta análise não impõe hierarquias as Unidades operacionais taxonômicas, e diminui a possibilidade de agrupamentos espúrios oriundos de pressuposições de métodos de agrupamento.

2.3.6. Estrutura de populações

Duas estratégias foram realizadas para quantificar a estrutura de populações entre e dentro as raças de ovinos analisadas. A primeira foi estimar por meio de uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) o quanto da variação observada foi devido a variação inter e intra racial e populacional. Essas diferenças foram quantificadas a partir de valores de F_{ST} e testadas por meio de *bootstrap* com 3000 repetições com o software Arlequin (Schneider *et al.*, 2000).

A outra estratégia foi utilizar o software Structure (Pritchard *et al.*, 2000) para inferir qual o número mais provável de populações que os genótipos analisados podem ser divididos dentro das raças estudadas. O programa

estima o logaritmo natural da probabilidade que um dado genótipo X seja membro de uma determinada população K ($= \ln P(X/K)$). Entretanto, o programa assume que as amostras analisadas estejam em EHW e que existem K populações com distribuição da frequência gênica desconhecida para cada loco p_{kl} com $K=1...K$ populações e $l=1...L$ locos que contribuam para o conjunto gênico da população alvo. Os alelos para cada loco são amostrados independentemente para cada indivíduo de acordo com a proporção q_i do seu genótipo em uma dada população. Para estimar as permutações que irão gerar a distribuição de probabilidade a *posteriori* para cada parâmetro (particularmente q_i e q_k) de maneira integrada sobre todos os demais parâmetros analisados, o software Structure usa o Método de Cadeia de Markov e simulações de Monte Carlo. Em resumo, isso significa que não é preciso especificar as frequências gênicas das possíveis populações ancestrais. O programa foi rodado duas vezes para valores de K que variaram de um a 18.

2.3.7. Testes de certificação racial (“Assignment tests”)

Para estimar a probabilidade de certificação racial, bem como inferir quais são as raças que possuem maiores índices de cruzamento foi utilizado o software GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004). A probabilidade dos indivíduos pertencerem a suas raças pré-estabelecidas foi estimada por um método de estatística bayesiana proposto por (Rannala e Mountain, 1997). Simulações de Monte Carlo foram utilizadas para criar as regiões de aceitação e rejeição da hipótese de cada indivíduo corresponder a sua raça de origem. Dessa forma, 10.000 genótipos para cada raça foram simulados.

2.4. Comparação entre marcadores microssatélites e RAPD

Como existem vários problemas genéticos e estatísticos com os marcadores moleculares RAPD reconhecidamente provados e descritos na literatura (Rabouam *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1998, Fritsch e Rieseberg, 1996; Lynch e Milligan, 1994) foi realizado um teste de comparação entre esses marcadores e os locos de microssatélites utilizados. Para permitir tal comparação, todas as principais análises estatísticas realizadas com os

indivíduos do Capítulo 1 a partir dos marcadores RAPD foram refeitas com os marcadores microssatélites. Os resultados obtidos podem auxiliar na determinação de qual nível de estrutura de populações as inferências com os marcadores RAPD podem ser utilizados em ovinos.

3.Resultados

3.1.Variabilidade Intra-racial

Dos 22 locos, três deles (OarFCB48, OarJMP29 e INRA05) foram retirados por dificuldades de tipagem. Os 19 locos restantes geraram 206 alelos nas 10 raças (média de 10,84 alelos/locos) com uma proporção média de animais tipados de 93,8 %. Foram gerados os índices básicos de diversidade, bem como de exclusão de paternidade para cada loco analisado (Tabela 3). Dos 19 locos, 16 apresentaram valores de H_o menores do que de H_e , o que sugere um excesso de homozigotos dentro das raças estudadas. O menor valor de H_o foi de 0,331 para HUI616 e o maior foi de 0,930 para MAF65, de maneira que a média observada para H_o foi de 0,682. Em relação aos valores de PIC, a média observada foi de 0,745 e os locos OarAE129 (0,546) e INRA23 (0,872) tiveram os menores e maiores valores, respectivamente. Outro resultado, que pode ser verificado na Tabela 3, é que o grau de informação de um marcador para exclusão de paternidade está correlacionado aos índices prévios de diversidade, principalmente o PIC.

Para aumentar a caracterização dos locos analisados, foram estimadas as estatísticas F de Wright (Tabela 4) e as probabilidades para inferência da presença de alelos nulos (Tabela 5). Dessa forma, foram observados valores fora dos intervalos de confiança da ordem de 63% para F_{IT} , 52% para F_{ST} e 78% para F_{IS} . Entretanto foi observado, em média, um valor de 13% de subdivisão da população (F_{IT}), 1,5% de consangüinidade (F_{IS}) e 12% de diferenciação entre as populações (F_{ST}). Apenas nos locos INRA23, OarFCB20, OarHH35, OMHC1, INRA63, MAF65 e MAF214 não houve evidência da existência de alelos nulos em uma das populações analisadas. Por outro lado, os locos que apresentaram de forma mais clara a possibilidade de existência de alelos nulos foram: ILSTS87 e HUI616(6 raças), OAE129 (5

raças), ILSTS05 (3 raças). Os demais locos apresentaram apenas uma ou duas raças indicando a presença de alelos nulos.

Tabela 3. Locos de microssatélites utilizados; número de alelos por loco (N); localização dos locos no genoma ovino (cromossomos - Cr); heterozigosidade observada (Ho); heterozigosidade esperada (He); conteúdo de informação polimórfica (PIC) e probabilidades de exclusão 1 (PE1) e 2 (PE2) para 19 locos de microssatélites analisados em 10 raças de ovelhas do Brasil.

Loco	N	Cr.	Ho	He	PIC	PE1	PE2
INRA23	11	1	0,846	0,884	0,872	0,614	0,763
OarFCB20	14	2	0,801	0,838	0,823	0,528	0,695
BM827	8	3	0,630	0,775	0,742	0,395	0,573
OarHH35	13	4	0,745	0,856	0,839	0,551	0,713
OarAE129	8	5	0,426	0,617	0,546	0,201	0,345
ILSTS87	13	6	0,710	0,874	0,860	0,590	0,744
ILSTS05	9	7	0,617	0,786	0,759	0,415	0,596
ILSTS11	8	9	0,631	0,776	0,741	0,386	0,565
INRA35	12	12	0,695	0,816	0,791	0,465	0,640
HUJ616	9	13	0,331	0,607	0,574	0,219	0,398
INRA63	12	14	0,894	0,860	0,842	0,555	0,716
MAF65	10	15	0,930	0,817	0,791	0,461	0,636
MAF214	9	16	0,775	0,621	0,560	0,209	0,364
SRCRSP05	5	18	0,577	0,700	0,641	0,269	0,433
OarFCB304	16	19	0,697	0,804	0,819	0,518	0,686
OMHC1	13	20	0,754	0,837	0,738	0,397	0,575
OarCP20	9	21	0,669	0,781	0,747	0,396	0,471
INRABern172	17	22	0,628	0,718	0,698	0,347	0,538
BM6526	10	26	0,604	0,759	0,738	0,395	0,581
MÉDIA	10,84	-	0,682	0,775	0,745	0,99998	0,99999

A Tabela 6 indica os índices de diversidade para cada raça analisada. Diferente do observado na Tabela 3, 50% das raças teve seus valores de Ho superiores aos de He, que evidencia as raças que podem não estar em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A raça com o maior valor de Ho foi a Santa Inês (0,7066) e a de menor valor foi a Ile de France (0,6319). Esse padrão foi o mesmo para os valores de PIC, embora a raça Corriedale apresentou valor mais baixo. Foram realizadas várias análises para estimar parâmetros genéticos. A diferença observada nos valores de alelos médios observados por raça, pode estar relacionada ao tamanho da amostra de cada raça. Entretanto, quando se observa o número de alelos efetivos por raça, essa amplitude

diminui bastante, especialmente na raça Santa Inês, a qual também apresenta o maior índice de polimorfismo.

Tabela 4. Índices de fixação dentro das populações (f), do conjunto das populações (F) e o coeficiente de parentesco entre indivíduos de populações diferentes (q) para cada loco analisado. Intervalos de Confiança (IC) em nível de 95%, estimados a partir de reamostragem por *bootstrapping*.

Lócus	F (F_{IT})	q (F_{ST})	f (F_{IS})
INRA23	0,059	0,121	-0,070
OarFCB20	0,060	0,110	-0,057
BM827	0,203	0,144	0,069
OarHH35	0,145	0,135	0,012
OarAE129	0,320	0,113	0,233
ILSTS87	0,195	0,065	0,139
ILSTS05	0,235	0,189	0,057
ILSTS11	0,201	0,127	0,084
INRA35	0,158	0,085	0,080
HUJ616	0,470	0,204	0,334
INRA63	-0,026	0,102	-0,142
MAF65	-0,126	0,085	-0,231
MAF214	-0,238	0,063	-0,321
SRCRSP05	0,194	0,144	0,059
OarFCB304	0,147	0,111	0,040
OMHC1	0,112	0,107	0,005
OarCP20	0,158	0,133	0,029
INRABern172	0,140	0,127	0,016
BM6526	0,221	0,160	0,073
Média	0,134	0,122	0,015
I.C 95%	0,073 – 0,194	0,107 – 0,137	-0,046 – 0,073

As raças naturalizadas, de maneira geral, apresentaram valores de diversidade relativamente maiores do que as raças comerciais ou recém introduzidas. Poucos alelos foram específicos para cada raça, e grande parte deles estão em baixíssima frequência na população, com exceção de quatro alelos observados nas raças Ile de France (2), Corriedale (1) e Dorper (1), que apresentaram frequências de 10-35%.

No caso da raça Santa Inês, o painel de marcadores permitiu realizar uma exclusão de paternidade com probabilidade 99,99% quando os genótipos

dos pais (PE1) são desconhecidos. Contudo, quando o genótipo de um dos pais (PE2) é conhecido, este nível de probabilidade de exclusão aplica-se para outras seis raças. Esses resultados podem ainda ser otimizados a partir da seleção de locos mais polimórficos.

Tabela 5. Testes da possível existência de alelos nulos comparando os 19 locos nas 10 raças de ovinos brasileiras analisadas. Os campos marcados em cinza indicam as possíveis combinações que sugerem a existência de alelos nulos.

	Santa Inês	Bergamácia	Rabo Largo	Morada Nova	Somalis	Hampshire	Ile de France	Corriedale	Damara	Dorper
INRA23										
OarFCB20										
BM827										
OarHH35										
OarAE129										
ILSTS87										
ILSTS05										
ILSTS11										
INRA35										
HUJ616										
INRA63										
MAF65										
MAF214										
SRCRSP05										
OarFCB304										
OMHC1										
OarCP20										
INRABern172										
BM6526										

Os valores de consangüinidade variaram de - 0,0115 (Corriedale) a 0,077 (Hampshire), de forma que nenhuma raça apresentou valores muito críticos (acima de 0,10). Entretanto foram observados excessos significativos de homozigotos nas raças Santa Inês, Morada Nova e Hampshire e excessos significativos de heterozigotos nas raças Somalis e Corriedale. Esses resultados corroboram que essas raças podem não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg ou apresentam alguma subestruturação de suas populações.

Tabela 6. Número de amostras (N); Heterozigosidade Esperada (He); Heterozigosidade Observada (Ho); conteúdo de informação polimórfica (PIC); Número médio de alelos por raça (A_M); Número efetivo de alelos por raça (A_E); Número de alelos diagnósticos por raça (A_D); probabilidades de exclusão 1 (PE1) e 2 (PE2); coeficiente de endogamia ao nível de indivíduo dentro de cada raça (F_{is}) e porcentagem de Desequilíbrio de Ligação (DL) para todos os pares de locos (p<0,01), para os 19 locos de microssatélites estudados nas dez raças de ovinos no Brasil. Desvio padrão entre parênteses.

Raça	N	He	Ho	PIC	A_M	A_E	A_D	PE1	PE2	F_{is}	DL (%)
Santa Inês	94	0,7585 (0,0225)	0,7066 (0,0112)	0,722	8,58 (2,46)	4,83 (1,92)	6	0,99994	0,99999	0,069**	2,34
Bergamácia	46	0,6864 (0,0335)	0,6880 (0,0160)	0,638	6,53 (2,29)	3,80 (1,51)	2	0,99926	0,99999	-0,002	4,09
Rabo Largo	48	0,6880 (0,0243)	0,7152 (0,0155)	0,634	6,32 (2,11)	3,55 (1,13)	-	0,99876	0,99999	-0,040	1,17
Morada Nova	48	0,7238 (0,0250)	0,6700 (0,0160)	0,680	7,21 (2,23)	4,12 (1,40)	4	0,99969	0,99999	0,075**	0,58
Somalis	48	0,5897 (0,0463)	0,6452 (0,0161)	0,538	5,32 (1,83)	3,02 (1,47)	-	0,99414	0,99992	-0,095****	3,51
Hampshire	24	0,7115 (0,0344)	0,6583 (0,0227)	0,657	6,32 (2,56)	4,46 (2,46)	3	0,99966	0,99999	0,077*	2,92
Ile de France	24	0,6327 (0,0502)	0,6319 (0,0230)	0,575	5,26 (1,73)	3,50 (1,60)	4	0,99772	0,99998	0,001	1,75
Corriedale	11	0,6276 (0,0369)	0,6960 (0,0331)	0,517	4,00 (1,33)	2,97 (1,14)	2	0,98822	0,99978	-0,115***	0,58
Damara	10	0,6251 (0,0495)	0,6578 (0,0372)	0,540	4,05 (1,54)	3,57 (2,01)	1	0,99446	0,99993	-0,055	1,75
Dorper	30	0,7042 (0,0267)	0,6878 (0,0204)	0,650	6,42 (2,09)	3,84 (1,36)	2	0,99924	0,99999	0,024	0

* excesso significativo de homozigotos p< 0,05; **excesso significativo de homozigotos após a correção de Bonferroni p<0,00026; excesso significativo de heterozigotos p< 0,05; ****excesso significativo de heterozigotos após a correção de Bonferroni p<0,00026

Foi observado que 15% das combinações não se encontraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e 7% apresentam um excesso de heterozigotos (Tabela 7). As raças Santa Inês e Morada Nova foram as que apresentaram maior número de locos (sete e seis, respectivamente) fora do equilíbrio bem como no teste global realizado. Além dessas duas raças, apenas três locos não se encontravam em equilíbrio nas raças Bergamácia, Hampshire e Ile de France. O teste global em relação aos locos analisados mostrou que nove marcadores não estão em EHW e apenas três apresentaram um excesso de heterozigotos.

O desequilíbrio gamético é a associação não ao acaso de alelos entre diferentes locos e a existência do mesmo foi testada entre todas as combinações de pares de locos possíveis (171) em cada raça estudada (Tabela 6) e em todas as raças como um grupo apenas (Tabela 8). O desequilíbrio observado dentro das raças variou de 0 a 4% das combinações entre todos pares de loco analisados e foi significativo ($p < 0,01$). Para o resultado global (Tabela 8) foi observado o desequilíbrio em 16% ($N=29$) das combinações possíveis. Contudo 62% ($N=18$) desses valores foram desequilíbrios significativos a $p < 0,05$, 31% ($N=9$) significativos a $p < 0,01$ e apenas 7% ($N=2$) foram altamente significativos ($p < 0,000001$).

Tabela 7. Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 19 locos e as 10 raças de ovinos brasileiras analisadas. Cinza escuro= $p < 0,01$ para deficiência de heterozigotos; Cinza claro= $p < 0,01$ para excesso de heterozigotos.

	Santa Inês	Bergamácia	Rabo Largo	Morada Nova	Somalis	Hampshire	Ile de France	Corriedale	Damara	Dorper	Teste Global Locos
INRA23			Cinza claro								
OarFCB20				Cinza escuro							
BM827				Cinza escuro	Cinza escuro						
OarHH35	Cinza escuro									Cinza escuro	
OarAE129	Cinza escuro	Cinza escuro	Cinza escuro	Cinza escuro							
ILSTS87	Cinza escuro	Cinza escuro	Cinza escuro	Cinza escuro		Cinza escuro	Cinza escuro				
ILSTS05				Cinza escuro		Cinza escuro	Cinza escuro				
ILSTS11				Cinza escuro	Cinza escuro						
INRA35	Cinza escuro	Cinza escuro	Cinza escuro								
HUJ616	Cinza escuro			Cinza escuro							
INRA63		Cinza escuro	Cinza escuro							Cinza escuro	
MAF65		Cinza escuro	Cinza escuro		Cinza escuro	Cinza escuro					
MAF214		Cinza escuro	Cinza escuro	Cinza escuro	Cinza escuro						
SRCRSP05					Cinza escuro		Cinza escuro				
OarFCB304											
OMHC1	Cinza escuro										
OarCP20	Cinza escuro										
INRABern172						Cinza escuro					
BM6526	Cinza escuro		Cinza escuro								Cinza escuro
Teste Global Raças	Cinza escuro	Cinza escuro		Cinza escuro		Cinza escuro	Cinza escuro				

Tabela 8. Matriz mostrando na diagonal inferior todas as combinações dos locos utilizados bem como a existência ou não de desequilíbrio gamético entre algum par. Desvio padrão entre parênteses. Cinza escuro = $p < 0,05$; Cinza claro = $p < 0,01$; X = p altamente significativo.

	INRA23	OarFCB20	BM827	OarHH35	OarAE129	ILSTS87	ILSTS05	ILSTS11	INRA35	HUJ616	INRA63	MAF65	MAF214	SRCRSP05	OarFCB304	OMHC1	OarCP20	INRABern172
INRA23	::																	
OarFCB20		::																
BM827			::															
OarHH35				::														
OarAE129					::													
ILSTS87						::												
ILSTS05							::											
ILSTS11						X		::										
INRA35									::									
HUJ616										::								
INRA63											::							
MAF65												::						
MAF214													::					
SRCRSP05														::				
OarFCB304															::			
OMHC1																::		
OarCP20																	::	
INRABern172																		::
BM6526																		

3.2. Variabilidade genética Inter-racial e Inter-populacional

As diferenças genéticas entre as raças estudadas foram representadas pelo método de NJ, baseado na distância Genética D_A de Nei (1983) (Figura 1). O dendrograma indica a existência de três grupos principais, um formado pelas raças naturalizadas brasileiras, outro pelas raças lanadas comerciais e um terceiro formado pelas raças africanas recém introduzidas. A raça Somalis Brasileira é a raça mais diferenciada dentre todas as raças locais do Brasil analisadas neste trabalho. Esses resultados são reforçados pelos valores de *bootstrap* observados para esses grupos.

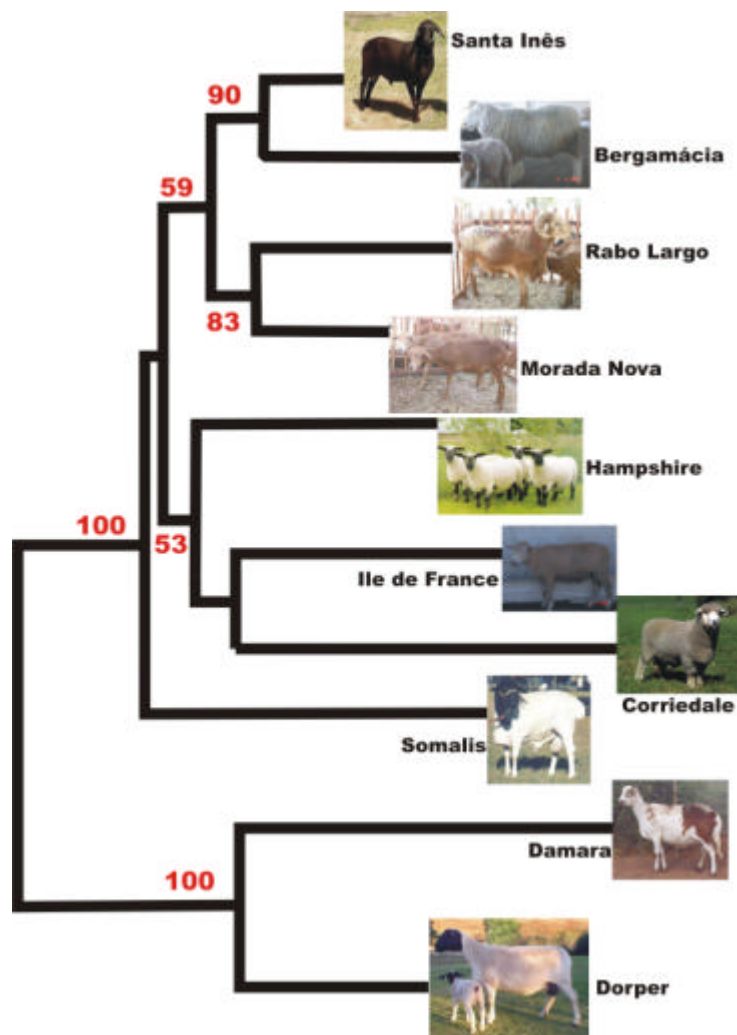


Figura 1. Dendrograma obtido a partir da distância genética D_A de Nei (1983) e o algoritmo de agrupamento *Neighbor Joining*, a partir de 19 loci de microssatélites evidenciando as relações entre dez raças de ovinos naturalizadas e comerciais brasileiras. Apenas Valores de *bootstrap* acima de 50% são indicados em cada nó.

A raça Santa Inês ficou mais próxima da Bergamácia, entretanto o baixo valor de *bootstrap* (59%) entre estas duas raças e as raças Morada Nova e Rabo Largo sugere que o grau de similaridade entre elas raças não foi completamente resolvido com esse conjunto de marcadores microssatélites.

A correlação entre todas as cinco matrizes de distâncias estimadas foi testada estatisticamente com Teste de Mantel (Tabela 9).

Tabela 9. Coeficientes de correlação entre diferentes tipos de distâncias genéticas a partir do Teste de Mantel.

	D_A	F_{ST}	R_{ST}	D_{SW}
D_A	---			
F_{ST}	0,8081*	---		
R_{ST}	0,6646*	0,6267*	---	
D_{SW}	0,7890*	0,7765*	0,9168*	---
D_C	0,9958*	0,8322*	0,6830*	0,8097*

* $p < 0,001$

Todas as correlações foram significativas e a maior correlação observada foi entre a distância D_A de Nei à distância *Chord* D_C (0,9958, $p < 0,001$), o qual é esperado, dada a semelhança de cálculo das duas distâncias. De forma semelhante, houve uma maior correlação entre as distâncias que tem uma tendência a se ajustarem ao modelo de alelos infinitos (D_A , D_C , F_{ST}) bem como entre as distâncias que se ajustam ao modelo de mutações passo a passo (R_{ST} , D_{SW}). A menor correlação foi observada entre os índices F_{ST} e R_{ST} (0,6267 $p < 0,01$).

Na análise de componentes principais para as 10 raças avaliadas, os dois primeiros componentes otimizaram 45,52% do total da variação observada (Figura 2). As raças naturalizadas brasileiras ficaram mais próximas entre si do qualquer uma delas com relação às raças comerciais e as africanas, exceto a raça Somalis Brasileira, a qual se apresentou mais diferenciada do que as outras raças brasileiras.

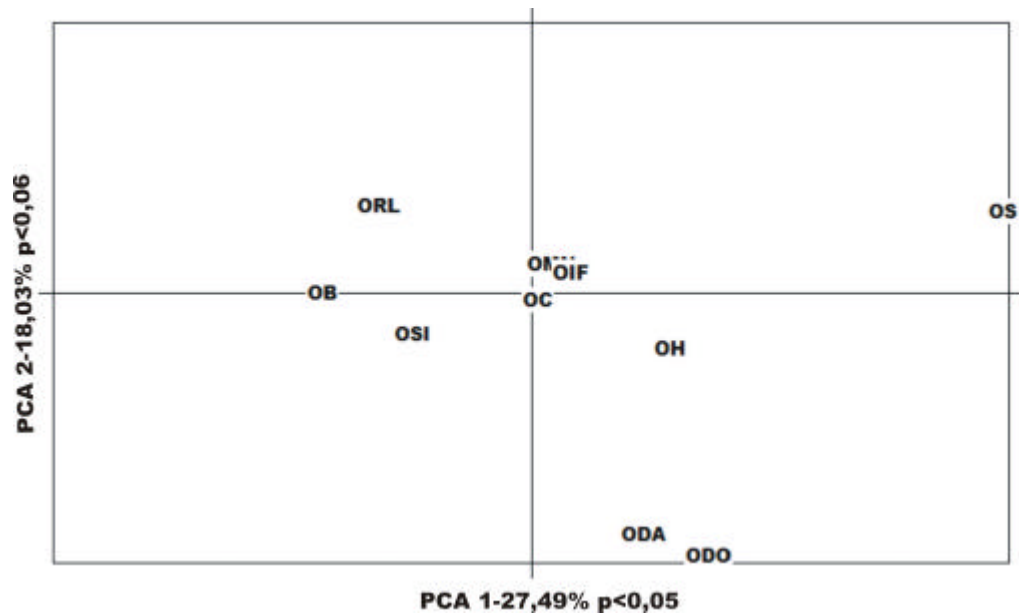


Figura 2. Análise de componentes principais de dez raças naturalizadas de ovinos brasileiros baseada nos valores de F_{ST} obtidos a partir de 19 locos de microssatélites. Valores de bootstrap foram obtidos para realizar o teste de significância para cada eixo. OSI=Santa Inês; OB=Bergamácia; ORL=Rabo Largo; OMN=Morada Nova; OS=Somalis; OH=Hampshire; OIF=Ile de France; OC=Corriedale; ODA=Damara; ODO=Dorper.

Com o objetivo de ver o comportamento das populações localizadas dentro das raças foi realizada uma análise de componentes principais considerando os rebanhos como unidades experimentais (Figura 3). Os dois primeiros componentes otimizaram 38,22% do total da variação observada. As populações pertencentes de cada raça ficaram mais próximas, exceto as populações de Santa Inês do Centro-Oeste e Sergipe que ficaram muito próximas da população de Bergamácia do Distrito Federal.

Dentre os rebanhos de Santa Inês, é clara uma divisão proporcionada pelo segundo componente principal de modo que a população do Maranhão parece ser a mais diferenciada. É importante observar também que as populações de Morada Nova continuam próximas às raças lanadas Corriedale e Ile de France.

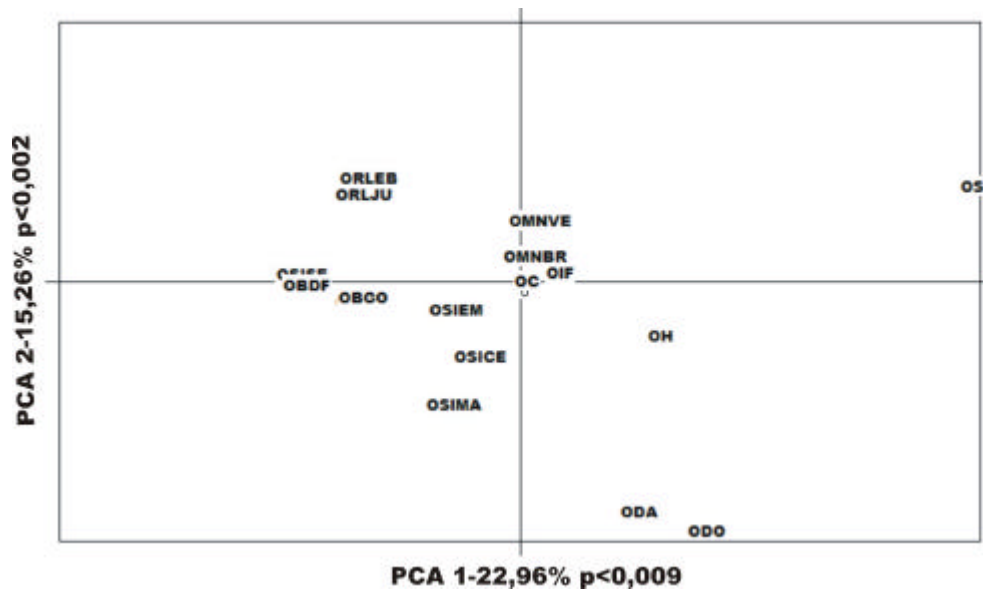


Figura 3. Análise de componentes principais de dez raças naturalizadas de ovinos brasileiros e seus rebanhos baseada nos valores de F_{ST} obtidos a partir de 19 locos de microssatélites. Valores de bootstrap foram obtidas para realizar o teste de significância para cada eixo. OSICO: Santa Inês Centro_Oeste; OSISE: Santa Inês Sergipe; OSIEM: Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros; OSIMA: Santa Inês Maranhão; OSICE: Santa Inês Ceará; OBDF: Bergamácia do Distrito Federal; OBGO: Bergamácia Goiás; ORLEB: Rabo Largo do EBDA; ORLEB: Rabo Largo Juazeiro; OMNVE: Morada Nova Vermelha; OMNBR: Morada Nova Branca; OS: Somalis; OH: Hampshire; OIF: Ile de France; OC: Corriedale; ODA: Damara; ODO: Dorper.

3.3. Estrutura de populações

O padrão hierárquico de estrutura populacional nos níveis de indivíduos, rebanhos e raças foi realizado com dois testes de AMOVA, de maneira que o primeiro tem objetivo de quantificar a variação existente entre e dentro das raças e o segundo, por sua vez, tem o objetivo de quantificar o quanto dessa proporção entre as raças é devido a variações entre rebanhos pertencentes a uma mesma raça (Tabela 10).

No primeiro teste, 11,76% ($p < 0,00001$) da variação total ocorreu entre as 10 raças analisadas. No segundo teste, a adição do nível de diferenças entre rebanhos na mesma raça indicou determinou que a variação das diferenças entre as raças caiu para 8,90% ($p < 0,00001$) da variação total e 4,46% ($p < 0,00001$) da variação foi observada entre rebanhos existentes dentro das raças analisadas (mais especificamente Santa Inês, Bergamácia, Rabo Largo e Morada Nova).

Tabela 10. Análise de variância molecular (AMOVA) para 332 indivíduos amostrados entre as dez raças de ovinos estudadas. Graus de liberdade (gl); soma de quadrados (SQ); componentes de variância (CV).

Fonte de variação	gl	SQ	CV	% Total	P-value
Entre as raças	9	566,390	0,77761	11,76	< 0,00001
Dentro das raças	756	4410,713	5,83428	88,24	< 0,00001
Entre as raças	9	567,606	0,58800	8,90	< 0,00001
Entre as populações dentro raças	7	122,787	0,29453	4,46	< 0,00001
Dentro das populações	749	4287,972	5,72493	86,64	< 0,00001

Após quantificar a variabilidade genética existente, foi realizada uma série de testes utilizando estatística bayesiana pelo programa Structure para inferir a existência de subestruturação dentro das raças ou mesmo testar a denominação raça dentro das ovelhas analisadas. Inicialmente foi realizado um teste piloto com todas as raças de maneira testando valores de K variáveis de 1 a 20, com corridas de padronização de 80.000 iterações. Posteriormente, mais 80.000 iterações adicionais foram realizadas a partir do Método de Cadeias de Markov e simulações de Monte Carlo para coleta dos resultados das probabilidades *a posteriori*. As raças Dorper e Damara prejudicaram os resultados tanto por serem significativamente diferentes das restantes bem como por serem muito semelhantes entre si. Dessa forma, a partir de certos valores de K , começaram a serem inferidos subgrupos espúrios dentro das raças naturalizadas sem que essas duas raças africanas tenham sequer se separado estatisticamente. É válido lembrar que essas duas raças são morfologicamente muito distintas e por isso elas aparentam realmente serem raças diferentes. A raça Corriedale também foi retirada em razão de sua baixa amostragem em relação às outras raças.

A análise definitiva foi realizada após eliminação das populações Dorper, Damara e Corriedale, resultando num total de sete raças. Foram realizadas duas análises independentes com os valores de K variando de 1 a 12 com corridas de padronização de 50.000 iterações e mais 50.000 iterações adicionais a partir do Método de Cadeias de Markov e simulações de Monte Carlo para coleta dos resultados.

A partir dos valores de $\ln P(X/K)$, os valores de alfa obtidos para cada valor de K e considerando outros fatores, como as probabilidades de

certificação para cada raça e um conhecimento prévio de suas histórias, foi determinado que valor de K que explica de forma mais adequada os dados fornecidos foi igual a nove [$\ln P(X/K) = -17.623,9$ $p < 0,034$]. A partir da escolha do valor $K(9)$ a Tabela 11 mostra a proporção das sete raças amostradas ao longo das nove populações inferidas.

Tabela 11. Proporção de indivíduos de cada uma das raças analisadas em relação às nove populações inferidas pelo programa Structure.

Raças	Populações Inferidas (K)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Santa Inês	0,060	0,023	0,019	0,037	0,445	0,026	0,022	0,013	0,354
Bergamácia	0,895	0,010	0,008	0,012	0,008	0,022	0,015	0,008	0,020
Rabo Largo	0,021	0,011	0,852	0,009	0,010	0,032	0,011	0,028	0,026
Morada Nova	0,013	0,009	0,012	0,009	0,020	0,434	0,029	0,444	0,029
Somalis	0,005	0,007	0,009	0,005	0,012	0,021	0,922	0,013	0,006
Hampshire	0,007	0,031	0,009	0,897	0,008	0,012	0,022	0,006	0,008
Ile de France	0,024	0,894	0,008	0,035	0,006	0,008	0,007	0,012	0,007
F_{ST} para K	0,1326	0,1950	0,1471	0,1143	0,0920	0,0885	0,2520	0,1657	0,1119

As quatro primeiras populações inferidas mais a sétima estão diretamente relacionadas, respectivamente as raças Bergamácia, Ile de France, Rabo Largo, Hampshire e Somalis. Pelos valores de probabilidade individuais, foi possível verificar que a estruturação dentro da raça Santa Inês aconteceu entre as populações do Centro-Oeste e Sergipe versus as populações do Ceará e Maranhão. Já em relação à raça Morada Nova, a subdivisão ocorreu entre as variedades Branca e Vermelha. Na Figura 4 é possível visualizar melhor as subdivisões.

Além das subdivisões, é possível identificar também os possíveis animais cruzados existentes em cada raça. Por exemplo, as populações de Santa Inês de Sergipe e do Centro Oeste (amarelo) são as que mais apresentam influências de outras raças. De maneira semelhante é possível ver alguns animais que não são puros dentro do rebanho da raça Somalis Brasileira. Esses animais, por exemplo, poderiam ser escolhidos para descarte em uma possível situação de manejo do rebanho.

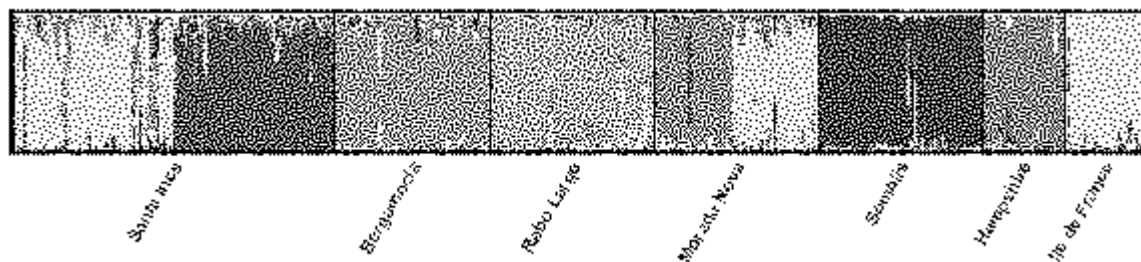


Figura 4. Gráfico com os valores de probabilidade individuais obtidos (matriz Q) para as sete raças de ovinos analisadas. As raças estão separadas pelas linhas negras verticais. Amarelo=OSICO/OSISE/OSIEM; Vermelho=OSICE/OSIMA; Azul=OMN Vermelha; Rosa=OMN Branca.

3.4. Testes de certificação racial

Os resultados de certificação racial dos indivíduos as respectivas raças por meio de 19 microssatélites são apresentados na Tabela 12 onde são mostrados os resultados de 10.000 indivíduos simulados para cada raça. As raças com maiores probabilidades de classificações corretas foram Damara (96,97%) e Dorper (90,52%), enquanto que as com menores probabilidades foram Bergamácia (80,84%) e Hampshire (81,54%).

As probabilidades de indicação dos indivíduos para cada raça, com base no genótipo, apresentaram grande variação entre as raças (Tabela 12). A raça Santa Inês apresentou o maior grau de partilhamento alélico (e conseqüentemente, menor probabilidade de reconhecimento genotípico), enquanto Somalis e Bergamácia apresentaram os maiores níveis de reconhecimento.

3.5. Comparação entre marcadores microssatélites e RAPD

O grau de resolução dos dois tipos de marcadores foi explorado tanto em níveis intra-raciais bem como inter-raciais. Quando a análise considerou os marcadores RAPD como base para cálculo de freqüências alélicas, os resultados foram incompatíveis com os obtidos com marcadores microssatélites, exceto no caso da raça Somalis, que apresentou os menores valores com ambos marcadores.

Tabela 12. Teste de certificação racial obtido a partir das probabilidades de máxima verossimilhança a partir de 19 microssatélites em 10 raças de ovinos.

	Santa Inês (OSI)	Bergamácia (OB)	Rabo Largo (ORL)	Morada Nova (OMN)	Somalis (OS)	Hampshire (OH)	Ile de France (OIF)	Corriedale (OC)	Damara (ODA)	Dorper (ODO)
OSI	0,89467	0,04083	0,07207	0,10244	0,00006	0,00655	0,00111	0,00023	0,00019	0,01325
OB	0,77999	0,80844	0,05399	0,10802	0,00002	0,00363	0,00312	0,00011	0,00004	0,00411
ORL	0,63178	0,01974	0,88006	0,27452	0,00018	0,02417	0,00122	0,00071	0,00007	0,00051
OMN	0,51948	0,00922	0,09734	0,82998	0,00056	0,00789	0,00021	0,00005	0,00033	0,00265
OS	0,42789	0,00221	0,03888	0,23760	0,82776	0,06886	0,00555	0,00011	0,00121	0,00229
OH	0,24717	0,00084	0,01218	0,01509	0,00019	0,81535	0,0048	0,00039	0,00005	0,00179
OIF	0,47978	0,00746	0,02417	0,08391	0,0001	0,09070	0,81655	0,00084	0,00001	0,00135
OC	0,6536	0,03966	0,05608	0,08924	0,0001	0,02093	0,02151	0,8675	0,00009	0,00708
ODA	0,07688	0,00005	0,00073	0,00123	0,00001	0,00007	0,00007	0,00001	0,96954	0,30108
ODO	0,06703	0,00003	0,00005	0,00215	0,00001	0,00003	0,00003	0,00001	0,04111	0,90561

Por outro lado, quando a análise de AMOVA foi baseado na presença/ausência de bandas para os marcadores RAPD, os dois tipos de marcadores deram valores numéricos próximos tanto em nível entre raças quando dentro das raças, sendo em ambos os casos, significativos. Por outro lado, a inclusão do nível hierárquico entre populações dentro de raças permitiu uma diferenciação entre RAPDs e STRs. Os marcadores de RAPD detectaram uma maior sub-estruturação dos rebanhos contidos dentro das raças do que os microssatélites. As diferenças numéricas entre estes dois tipos de marcadores foi testada considerando o reconhecimento da estrutura de rebanhos a partir de matrizes processadas por meio da distância genética de Nei (1972) e o algoritmo de agrupamento *Neighbor joining* para ambos os conjuntos de marcadores RAPD (Figura 5) e microssatélites (Figura 6).

Após comparar as Figuras 5A e 5B é possível verificar uma alta similaridade entre os dendrogramas obtidos para diferenciar as raças de ovinos analisadas. Tal resultado foi corroborado pelo teste de Mantel em que foi observada uma correlação de $r=0,8949$ ($p<0,001$) entre as matrizes de distâncias obtidas pelos diferentes marcadores.

Tabela 13. Comparação de índices de diversidade gênica entre 54 marcadores RAPD e 19 locos STR (H) obtidos a partir de 238 ovelhas pertencentes a cinco raças naturalizadas brasileiras. (H_{pop}) índices de cada população, (H_{total}) índices de cada raça. (M) número de marcadores/ alelos específicos para cada raça

População/ Raça	N	RAPD		STR	
		D_{pop}	D_{total}	H_{pop}	H_{total}
OSI CO ⁽¹⁾	15	0.3639		0,7350	
OSI SE ⁽²⁾	17	0.3799	0.3881	0,7632	0,7585
OSI EM ⁽³⁾	16	0.3592		0,6753	
OB DF ⁽⁴⁾	33	0.3472		0,6761	
OB GO ⁽⁵⁾	13	0.3735	0.3857	0,6310	0,6864
ORL EB ⁽⁶⁾	28	0.4000		0,6686	
ORL JU ⁽⁷⁾	20	0.3771	0.4050	0,6904	0,6880
OMN VE ⁽⁸⁾	23	0.3848		0,6766	
OMN BR ⁽⁹⁾	25	0.3530	0.3929	0,7156	0,7238
OS ⁽¹⁰⁾	48	0.3229	0.3229	0,5897	0,5897

⁽¹⁾OSI CO: Santa Inês Centro Oeste. ⁽²⁾OSI SE: Santa Inês fazendas Sergipe. ⁽³⁾OSI EM: Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE. ⁽⁴⁾OB DF: Bergamácia da Universidade de Brasília. ⁽⁵⁾OB GO: Bergamácia fazendas Goiás. ⁽⁶⁾ORL EB: Rabo Largo do EBDA (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Bahia). ⁽⁷⁾ORL EB: Rabo Largo Juazeiro, BA. ⁽⁸⁾OMN VE: Morada Nova Vermelha. ⁽⁹⁾OMN BR: Morada Nova Branca. ⁽¹⁰⁾OS: Somalis.

Tabela 14. Comparação dos valores de Análise de Variância Molecular (AMOVA) obtidos entre marcadores RAPD e STR a partir de 238 ovelhas pertencentes a cinco raças naturalizadas brasileiras.

Fontes de variação	gl ⁽¹⁾	RAPD		STR	
		% Total	P-value	% Total	P-value
Entre as raças	4	14,92	< 0,01	11,16	<0,01
Dentro das raças	233	85,08	< 0,01	88,84	< 0.01
Entre as raças	4	9,54	< 0,01	8,50	<0,01
Entre populações dentro raças	5	9,27	< 0,01	4,55	< 0.01
Dentro das populaces	228	81,19	< 0,01	86,94	< 0.01

⁽¹⁾ Graus de liberdade (gl);

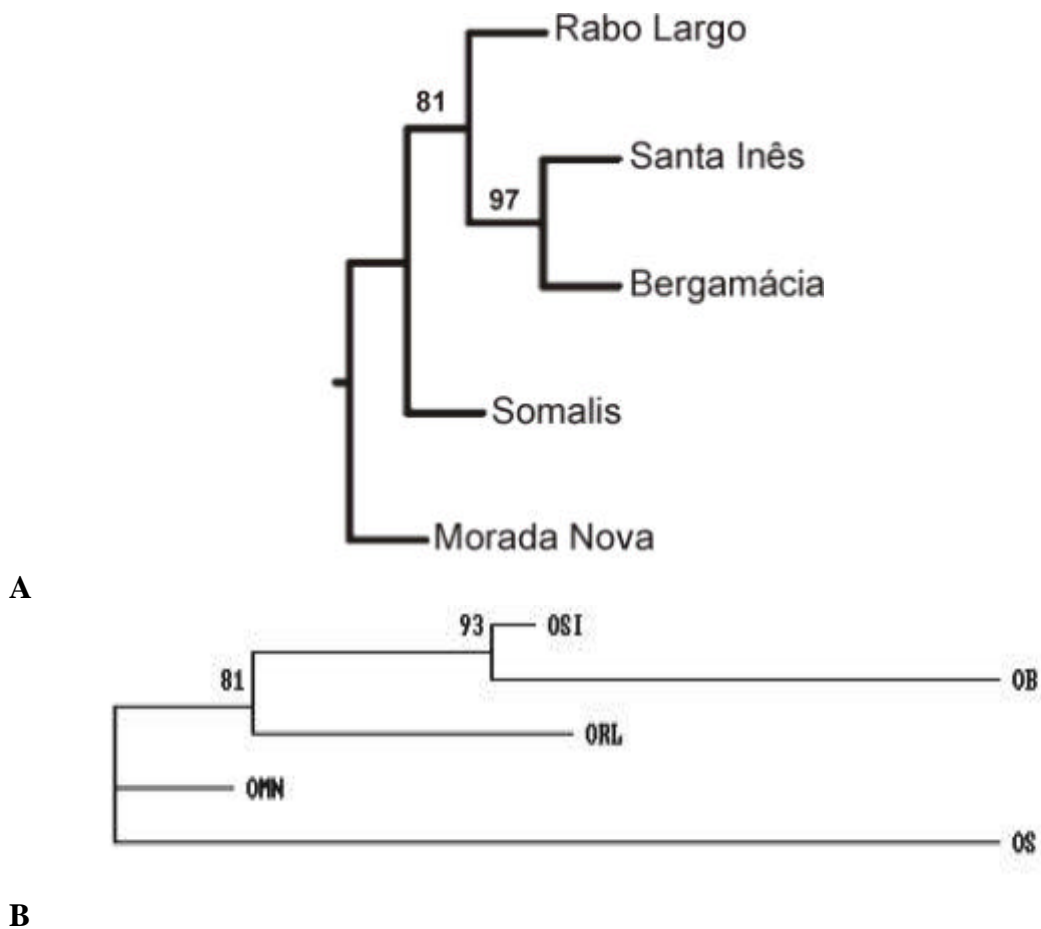


Figura 5. Dendrogramas obtidos a partir da distância genética de Nei (1972) e o algoritmo de agrupamento *Neighbor joining*, a partir de 54 locos de RAPD (A) e a partir de 19 locos de microssatélites evidenciando as relações entre cinco raças de ovinos naturalizadas brasileiras. Apenas os valores de *bootstrap* acima de 50% são indicados. OSI: Santa Inês; OB: Bergamácia; ORL; OMN; OS: Somalis.

Entretanto, após comparar as Figuras 6A e 6B, fica claro que os 54 marcadores RAPD não foram suficientes para resolver as relações existentes entre os rebanhos dentro de cada raça. Já os marcadores microssatélites agruparam juntos todos os rebanhos pertencentes a uma mesma raça. Novamente, o teste de Mantel corroborou os resultados observados nos dendrogramas com um valor de correlação de $r=0,7036$ ($p<0,002$) entre as matrizes de distâncias.

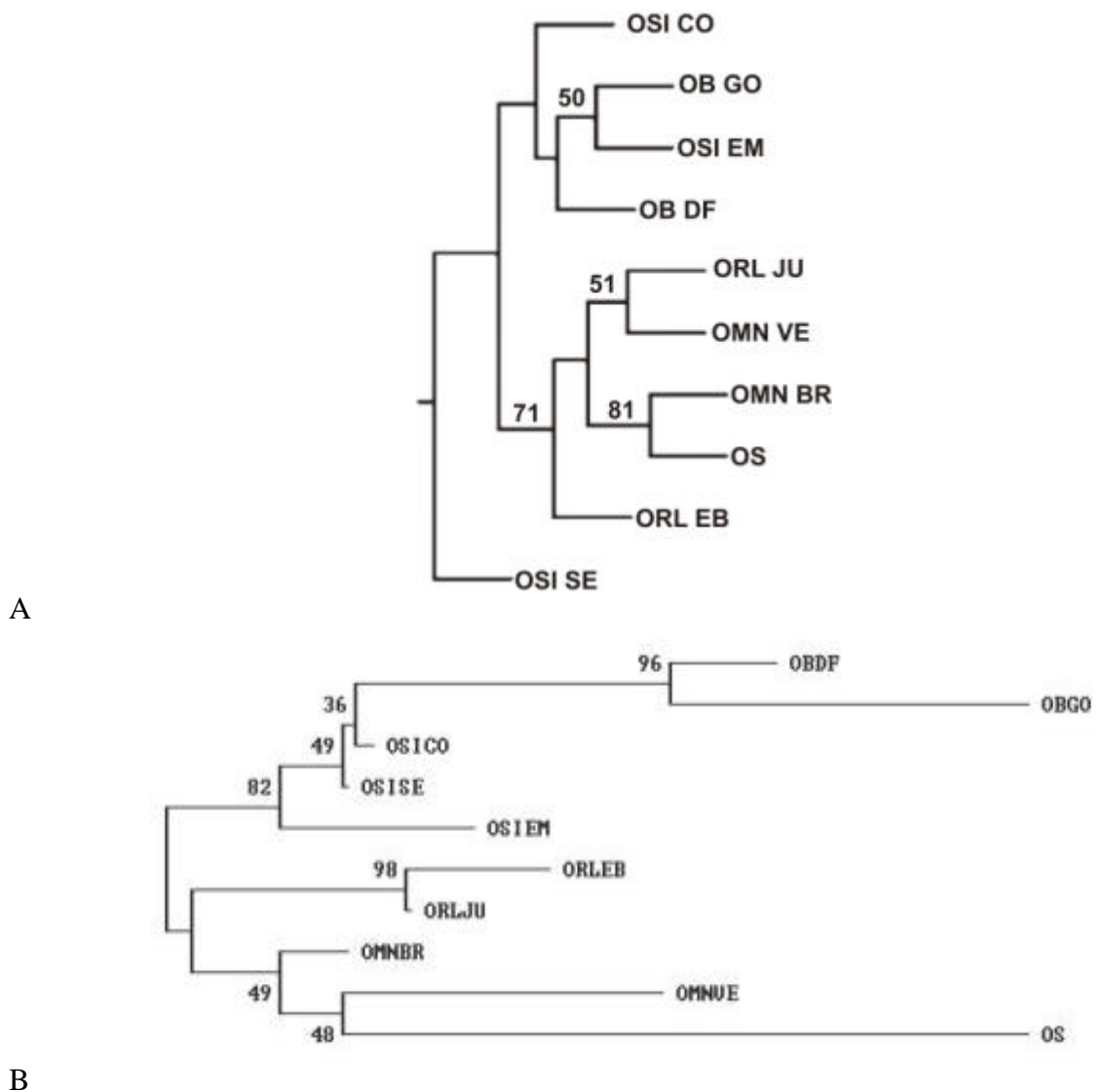


Figura 6. Dendrogramas obtidos a partir da distância genética de Nei (1972) e o algoritmo de agrupamento *Neighbor joining*, a partir de 54 locos de RAPD (A) e a partir de 19 locos de microssatélites (B) evidenciando as relações entre cinco raças de ovinos naturalizadas brasileiras e seus rebanhos. Valores de *bootstrap* são indicados em cada nó principal. OSICO: Santa Inês Centro_Oeste; OSISE: Santa Inês Sergipe; OSIEM: Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros; OBDF: Bergamácia do Distrito Federal; OBGO: Bergamácia Goiás; ORLEB: Rabo Largo do EBDA; ORLEB: Rabo Largo Juazeiro; OMNVE: Morada Nova Vermelha; OMNBR: Morada Nova Branca; OS: Somalis

4. Discussão

Este estudo revelou padrões de variabilidade genética e estrutura de populações existentes em 10 raças de ovelhas espalhadas pelo Brasil. Dessa forma, este trabalho foi principalmente de pesquisa básica, mas com visões de

aplicações futuras de técnicas moleculares para melhoramento e conservação de raças de ovelhas.

Considerando que os marcadores microssatélites são polimorfismos neutros, três forças principais podem ser usadas para explicar os padrões de diversidade genética observados: mutação, deriva genética e migração. Como o processo de mutação é importante apenas em estudos que envolvem táxons que estão separados por longos períodos de tempo, pode ser aceito que as verdadeiras forças que promoveram grande parte dos resultados foi à deriva genética, como fonte de contribuições de diversidade e a migração, do lado oposto, como fonte de homogeneização das raças estudadas. É importante mencionar que o isolamento reprodutivo, uma ação comum de manejo e manutenção de rebanhos, reduz os tamanhos efetivos populacionais e contribui para a subdivisão das raças. Contudo, segundo Cañon *et al.* (2001), estes manejos podem ser detectados a partir de metodologias baseadas em análises de diversidade por marcadores neutros do tipo microssatélites.

Os níveis de variação genética intra-raciais observados para as ovelhas brasileiras tais como os valores de H_o , H_e e PIC iguais a, respectivamente, 0,682, 0,775 e 0,745 são relativamente semelhantes a valores obtidos em estudos de diversidade genética em rebanhos de ovinos na literatura (Alvarez *et al.*, 2004; Tapio *et al.*, 2003; Arranz *et al.*, 2001, Arranz *et al.*, 1998). Contudo, comparações mais profundas com outros trabalhos são dificultadas em razão da diferença de amostragens e marcadores utilizados.

As amostragens realizadas ao longo das raças foram desiguais e, pelo menos duas raças, Corriedale e Damara, não se encaixaram no número mínimo de 25 animais por raça proposto pela FAO (1998). Segundo Baumung *et al.*, (2004), as amostragens têm sido um ponto bastante focalizado pelas equipes de pesquisas que realizam trabalhos com microssatélites e segundo um levantamento, 95% de todos os projetos realizados com microssatélites monitorados pela FAO até o momento, seguem as recomendações de amostragens. Uma saída para as raças com baixa amostragem seria ou retirar as mesmas das análises ou, tentar aumentar sua amostragem. Especificamente nesse trabalho, análises futuras podem ser realizadas sem essas raças para verificar se os padrões observados não se alteram ou se esta alteração é não significativa.

Apesar das críticas (ex., Balloux *et al.*, 2002; Hedrick, 1999), as estatísticas F são uma excelente análise para verificar a qualidade dos marcadores utilizados bem como para estimar alguns parâmetros genéticos das populações estudadas. Dessa forma, essas estatísticas, junto com os resultados que sugerem possíveis alelos nulos, serão imprescindíveis para formação de um painel específico para estudos de diversidade genética em rebanhos de ovinos.

A diferença numérica entre o número médio de alelos e o número efetivo de alelos por raça pode sugerir a ocorrência de eventos recentes de estrangulamento populacional (*bottleneck*), visto que os baixos valores de A_E sugerem que poucos alelos estão em grande frequência na população. Outra maneira de se identificar esses eventos é pela baixa quantidade de alelos diagnósticos presentes numa população associada a altos valores de heterozigidade (Zabeck *et al.*, 2005). Contudo, não foi realizado um teste específico para identificar a presença significativa de eventos de *bottlenecks* como descrito por Alvarez *et al.* (2005).

Os valores significativos de consangüinidade bem como de desequilíbrio das proporções de Hardy-Weinberg observados nas raças Santa Inês e Morada Nova, podem ser justificados pela presença de rebanhos bem diferenciados dentro de suas amostragens, que provavelmente possuem manejos diferenciados (seleção) em cada uma das localidades de amostragem e alguns destes estão isolados reprodutivamente dos outros. Os animais da raça Santa Inês foram coletados em cinco locais diferentes, de maneira que quatro desses locais eram de propriedades particulares e apenas um local era de um rebanho pertencente à instituição pública (Embrapa Tabuleiros Costeiros- SE). Os animais Morada Nova foram coletados no Ceará. As variedades Vermelha e Branca pertencem à Embrapa Caprinos e à Universidade Federal do Ceará. Neste caso específico esses resultados eram até esperados em razão de haver uma seleção para manutenção de, pelo menos, da pelagem entre esses rebanhos de conservação.

É sabido que muitos rebanhos de conservação e até mesmo rebanhos comerciais no Brasil não possuem seus registros genealógicos organizados. Em razão disso, o monitoramento e manutenção da consangüinidade com o uso de marcadores moleculares em rebanhos pouco ou não controlados é uma medida plausível até que se organizem os dados genealógicos e de produção.

Pariset *et al.* (2003), avaliaram satisfatoriamente o índice de consangüinidade a partir de 11 marcadores microssatélites em 17 rebanhos da ovelha Sarda, nativa da Itália para auxiliar na manutenção dos estoques dessa raça.

Outros valores a serem discutidos a partir da Tabela 6 é o fato da raça Somalis Brasileira apresentar os menores valores para heterozigosidades e PIC, mas apresentar um índice de consangüinidade muito baixo a ponto de apresentar um excesso significativo de heterozigotos. Esta raça foi também a mais diferenciada dentre todas as naturalizadas analisadas. Estes resultados podem ser explicados provavelmente pelo correto manejo, o qual permitiu a manutenção da variabilidade genética, apesar dela ser a menor entre as raças. Uma amostragem mais ampla permitirá determinar o padrão observado é uma característica da raça no Brasil ou se é característico de um rebanho fechado por um grande período de tempo.

Foram identificados valores de desequilíbrio de ligação entre pares de locus não ligados fisicamente maiores do que os esperados ao acaso tanto para algumas das raças analisadas bem como para o teste geral. McRae *et al.* (2002) indicaram que tais padrões podem ser observados em populações de ovelhas com histórias de co-ancestralidade recente para alguns indivíduos. Dessa forma, esse resultado é uma evidência adicional da existência de indivíduos cruzados em algumas dessas raças bem como pode ser também em razão de eventos de deriva genética nas raças reconhecidamente fechadas (Tapio *et al.*, 2003).

Em relação à variabilidade inter-racial, a distância D_A de Nei (1983) se mostrou eficiente quando estimada a partir de marcadores microssatélites. Outros autores já haviam também obtidos resultados plausíveis a partir dessa distância (Fang *et al.*, 2004; Tapio *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 1998). Quando os resultados obtidos na análise de componentes principais da Figura 3 são analisados em conjunto com os resultados de EHW e DL apenas reforçam a hipótese da existência de cruzamentos recentes pelo menos entre as raças Bergamácia e Santa Inês.

Os resultados obtidos pela AMOVA para diferenças entre raças (11,76%) são muito parecidos com valores estimados para animais domésticos quando analisados com microssatélites. Esses valores oscilam, geralmente, de 7-12% da variação total (Hamann *et al.*, 2004 para eqüinos, Yang *et al.*, 2003 para suínos, Cañon *et al.*, 2001 para bovinos e Arranz *et al.*, 2001 para ovinos).

Novamente, o segundo teste da AMOVA (Tabela 10) sugere a existência de subestruturação entre algumas das raças analisadas.

No caso da raça Santa Inês, as estatísticas bayesianas permitiram a caracterização de dois grupos principais, um localizado em Sergipe e Centro Oeste, com influência genética de outras raças e um mais puro ou menos cruzado, localizado nos Estados mais ao Norte da Região Nordeste (Ceará e Maranhão). Este padrão é consistente com a hipótese da existência da “Velha Santa Inês” versus a “Nova Santa Inês”. Criadores e técnicos do meio da ovinocultura que classificam como Velha Santa Inês, aqueles animais menores e mais rústicos existentes nas décadas de oitenta e início da década de noventa. Os animais representativos atuais correspondem à Nova Santa Inês e que possuem características morfológicas externas (como por exemplo, um grande quarto traseiro) e que parecem pouco prováveis de serem resultado de um programa de melhoramento. Marcadores moleculares podem contribuir para a identificação dos estoques que contribuíram para estas rápidas mudanças na raça.

Foi também observada uma estruturação significativa dentro da raça Morada Nova. Considerando que os efetivos populacionais das duas variedades da raça Morada Nova são numericamente baixos, o padrão pode ser explicado por forte seleção direcional e pela perda não seletiva de alelos. Até a presente data há registro de apenas dois Núcleos de conservação existentes para a variedade Vermelha (Embrapa Caprinos, CE e Instituto de Zootecnia, São Paulo) e apenas um Núcleo para a variedade Branca (Universidade Federal Ceará, CE). Como os dados de microssatélites mostraram uma diferença significativa entre as duas variedades, as duas têm de serem consideradas como unidades de manejo separadas (Moritz, 1994).

A raça Rabo Largo, apesar de ter sido coletada em duas localidades distintas no Estado da Bahia, não apresenta sub-estruturação aparente, apesar de pertencer alguns indivíduos cruzados com influência maior da raça Morada Nova. É uma raça com baixos efetivos e que apresenta pelo menos dois Núcleos de Conservação no Brasil, um localizado na Paraíba e um na Bahia. Havia uma hipótese que ela poderia ter sido originada da raça africana Damara, contudo, suas frequências gênicas foram extremamente diferentes. Entretanto, marcadores moleculares com uma taxa de mutação mais

conservadora devem ser utilizados para testar essa hipótese novamente, visto que os microssatélites apresentam uma alta taxa de mutação.

Apesar de não terem sido encontrados valores muito significativos de certificação racial para todas as raças estudadas (Tabela 12), novos testes serão realizados utilizando apenas os marcadores mais informativos deste painel bem como novos marcadores. Arranz *et al.* (2001a), em análises de duas raças espanholas de ovinos, sugerem que 20-25 marcadores já poderiam ser suficientes para testes iniciais de certificação. Por outro lado, estes resultados são importantes não apenas para uma raça específica, mas sim quando se compara pares de raças, de forma que esse painel de microssatélites possa se tornar bem útil para determinadas ocasiões de cruzamentos inter-raciais.

Adicionalmente, esses resultados reforçam bastante a influência de outras raças em relação à Santa Inês. Este aspecto pode ser interpretado, em relação à origem dessa raça, em pelo menos de duas formas: a primeira seria que realmente a raça Santa Inês teve uma formação bastante complexa, influenciada pelas raças lanadas atuais (como Bergamácia), que para compreendê-la melhor, seria necessário uma amostragem maior, com a inclusão de mais raças, como, por exemplo, Texel e Suffolk. Esta hipótese é consistente com os altos valores de variabilidade genética intra-racial observados nesses animais. Outra estratégia seria adicionar mais marcadores no futuro para aumentar o poder de classificação para essa raça, visto que é a que mais cresce nos últimos anos e vem sendo alvo de cruzamentos absorventes. Pelo menos para os marcadores microssatélites, os dados não confirmam a hipótese de que a raça Rabo Largo é derivada da Damara.

A comparação entre os marcadores RAPD e microssatélites permitiu um maior conhecimento de ambas as técnicas de maneira que, pelo menos para os ovinos, é possível recomendar a aplicação de uma técnica específica para determinados níveis de análise. Assim, os marcadores RAPD foram satisfatórios em nível de variação inter-racial. Na análise de rebanhos dentro de uma raça, os marcadores microssatélites foram mais informativos. Em outros estudos comparativos com essas mesmas técnicas, Nybon (2004) e Sun *et al.* (1998) indicaram associações entre as duas técnicas. A diferença observada provavelmente é em razão da variabilidade de “alelos” existentes entre microssatélites e RAPD. Ou seja, nos marcadores RAPD existem apenas dois

“alelos”/fenótipos (presença ou ausência da banda) e já os microssatélites são locos multialélicos. Quanto maior essa variabilidade menor a diferença de freqüências entre classes alélicas e conseqüentemente, menor diferenciação entre as populações estudadas.

5. Conclusões

1. Os marcadores microssatélites são desejáveis para manutenção de rebanhos de uma mesma raça.
2. As raças naturalizadas foram mais polimórficas do que as raças comerciais.
3. Foi possível identificar forte influência da raça Bergamácia brasileira na origem recente da raça Santa Inês.
4. A raça Santa Inês se apresenta subestruturada em pelo menos dois grandes grupos.
5. As variedades Branca e Vermelha da raça Morada Nova podem ser consideradas grupos genéticos distintos.
6. A raça Somalis Brasileira apresentou a maior integridade genética e diferenciação dentre todas as raças naturalizadas analisadas.
7. O painel de marcadores utilizado foi efetivo para realização de testes de exclusão de paternidade para grande parte das raças.

6.Referências Bibliográficas

- Aberle K.S., Hamann H., Drogemuller C., Distl O. (2004). Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal Genetics*, 35:270-277.
- Alvarez I., Royo L.J., Fernández I., Gutiérrez J.P., Gómez E., Goyache F. (2004). Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *J. Anim. Sci.* 82:2246-2252.
- Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F. (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Animal Genetics* 29, 435-440.
- Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F. (2001). Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet. Sel. Evol.* 33, 529-542.
- Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F. (2001a). Diferenciación entre razas ovinas autóctonas y foráneas aplicando secuencias microsatélites. *Archivos de Zootecnia*, 50:27-33.
- Balloux F., Lugon-Moulin N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11:155-165.
- Baumung R., Simianer H., Hoffmann I. (2004). Genetic diversity studies in farm animals – a survey. *J. Anim. Breed. Genet.* 121, 361-373.
- Beaumont M.A., Bruford M.W. (1999). Microsatellites in conservation genetics. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds. Goldstein D.B., Schlotterer C.), pp.165-182. Oxford University Press, New York.
- Bennett L.B., Shriver M.D., Bowcock A.M. (1998). Markers and methods for reconstructing modern human history. *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping*, 8 (5):329-341.
- Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Solinas Toldo S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J. & Beattie C.W. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136, 619-639.
- Bohonak A.J. (2002). IBD (Isolation by Distance): A Program for analyses of isolation by distance. *The Journal of Heredity* 93(2): 153-154.
- Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P. (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13, 3261–3273.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Brezinsky L., Kemp S.J., Teale A.J. (1993b). 5 polymorphic bovine microsatellites (ILSTS010-014). *Animal Genetics* 24, 75-76.
- Brezinsky L., Kemp S.J., Teale A.J. (1993). ILSTS005 - a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics* 24, 73.
- Broom J.E., Tate M.L., Dodds K.G. (1996) Linkage mapping in sheep and deer identifies a conserved Pecora ruminant linkage group orthologous to two regions of HSA 16 and a portion of HSA7Q. *Genomics* 33, 358-364.

- Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4:900-911.
- Buchanan F.C., Galloway S.M., Crawford A.M. (1993a). Ovine microsatellites at the OarFCB5, OarFCB19, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB129 and OarFCB226. *Animal Genetics* 25, 60.
- Buchanan F.C., Littlejohn R.P., Galloway S.M., Crawford A.M. (1993b). Microsatellites and associated repetitive elements in the sheep genome. *Mammalian Genome* 4, 258-264.
- Buchanan F.C., Crawford A.M. (1992). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF214 locus. *Anim. Genet.* 23, 393-394.
- Buchanan F.C., Crawford A.M. (1993). Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. *Animal Genetics* 24, 145.
- Buchanan F.C., Swarbrick P.A., Crawford A.M. (1991). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF65 locus. *Anim. Genet.* 23, 85-85.
- Cañon J., Alexandrino P., Bessa I., Carleos C., Carretero Y., Denner S., Ferran N., Garcia D., Jordana J., Laloe D., Pereira A., Sanchez A., Moazami-Goudarzi K. (2001). Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet. Sel. Evol.* 33:311-332.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Gen.* 19: 233-257.
- De Gortari M.J., Freking B.A., Kappes S.M., Leymaster K.A., Crawford A.M., Stone R.T. & Beattie C.W. (1997). Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Animal Genetics* 28, 274-290.
- Domingues O. (1968). *Introdução à Zootecnia*. 3.ed. Série Didática 5, Rio de Janeiro, 386p.
- Ede A.J., Pierson C.A. & Crawford A.M. (1995). Ovine microsatellites at the OarCP9, OarCP16, OarCP20, OarCP21, OarCP23 and OarCP26 loci. *Anim. Genet.*, 26, 128-9.
- Eding J.H, Laval G. (1998). Measuring genetic uniqueness in livestock. In: *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources*. Oldenbroek J.K., (Ed), p.33-58. ID-DLO, The Netherlands, 119p.
- Efron, B. (1985). Bootstrap confidence intervals for a class of parametric problems. *Biometrika* 72, 45-58.
- Fang M., Hu X., Jiang T., Braunschweig M., Hu L., Du Z., Feng J., Zhang Q., Wu C., Li N. (2004). The phylogeny of Chinese indigenous pig breeds inferred from microsatellite markers. *Animal Genetics*, 36:7-13.
- FAO (2004). *Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetics Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers*. Acessado em dezembro de 2004, Disponível em <<http://dad.fao.org>>.
- FAO, (1998). *Secondary Guidelines for development of National Farm Animal Genetics Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Original Working Group Report*. Acessado em Dez 2003. Disponível em <http://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/workgrp.pdf>.

- FAO. (1993). An Integrated Global Programme to Establish the Genetic Relationships Among the Breeds of each Domestic Animal Species (Report of a working group, June 1993), Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farid A., O'Reilly E., Dollard C., Kelsey CR. (2000). Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. *Canadian Journal of Animal Science* 80(1):9-17.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2003). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: United Kingdom at the University Press. pp.1-40.
- Fritsch, P., Rieseberg, L.H. (1996). The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.54-73. Oxford Press University, New York.
- Goudet J. (2002). FSTAT Version 2.9.3.2 for windows: a computer program to calculate F-statistics. Acessado em 210/12/2003. Disponível em <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Goudet J (1999). PCA-GEN, Version 1.2. Institute of Ecology, Biology Building, UNIL, Lausanne, Switzerland.
- Groth D.M., Wetherall J.D. (1994). Dinucleotide polymorphism within the ovine major histocompatibility complex class I region. *Anim. Genet.* 25, 61.
- Guo S.W., Thompson E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Hall S.J.G., Bradley D.G. (1995). Conserving livestock breed biodiversity. *TREE* 10 (7): 267- 270. 1995
- Hamond K. (1996). FAO's global programme for the management of farm animal genetic resources. In: *Proceedings of IGA/FAO Round Table on The Global Management of Small Ruminant Genetic Resources*, Beijing, p.4-13.
- Hedrick P.W. (1999). Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53:313-318.
- Henry H.M., Penty J.M., Pierson C.A., Crawford A.M. (1993). Ovine microsatellites at the OarHH35, OarHH41, OarHH44, OarHH47 and OarHH64 loci. *Anim. Genet.* 24,222.
- Kemp S.J., Hishida O., Wambugu J., Rink A., Longeri M.L., Ma R.Z., Da Y., Lewin H.A., Barendse W. & Teale A.J. (1995). A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics* 26, 299 - 306.
- Luikart G., Cornuet J.-M., Allendorf F.W. (1999). Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size. *Conserv. Biol.* 13:523-530.
- Lynch, M., Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD makers. *Molecular Ecology*, v.3, p.91-99.
- MacHugh D.E., Loftus R.T., Bradley D.G., Sharp P.M., Cunningham P. (1994). Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond. B* 256, 25–31.

- Maddox J.F., Schibler L., Cribru E.P., Kang N., Davies K.P., Vaiman D. (2000). Linkage mapping of goat ChirUCO, LSCV and SR-CRSP microsatellites in sheep. *Animal Genetics* 31, 145. correction 292-293.
- Marsan P.A. and ECONOGENE Consortium. (2005). Overview of ECONOGENE, an European project that integrates genetics, socio-economics and geo-statistics for the sustainable conservation of sheep and goat genetic resources. *In: The Role of Biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources*. Villa Gualino, Turin, Italy, Book of Proceedings, p.89-96.
- Marshall T.C., Slate J., Kruk L., Pemberton J.M. (1998). Statistical Confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, v.7(5), p.639-655.
- McRae, A.F., McEwan J.C., Dodds K.G., Wilson T., Crawford A.M. (2002). Linkage disequilibrium in domestic sheep. *Genetics*, 160:1113-1122.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v.16, p.1215.
- Moritz C. (1994). Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 373-375.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Nei M. (1972). Genetic distance between populations, *Am. Naturalist*, 106, 283-292.
- Nei, M., Tajima, F., and Tateno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19:153-170.
- Nybon H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13:1143-1155.
- OTA T. (1993). *DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis*. Pennsylvania State University Park, PA.
- Pariset L., Savarese M.C., Cappuccio I., Valentini A. (2003). Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *J. Anim. Breed. Genet.*, 120: 425-432.
- Penty J.M., Henry H.M., Ede A.J., Crawford A.M. (1993). Ovine microsatellites at the OarAE16, OarAE54, OarAE57, OarAE119 and OarAE129 loci. *Anim. Genet.* 24, 219.
- Pérez T., Albornoz J., Domínguez A. (1998). An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, v.7, p.1347-1357.
- Peter C., Prinzenberg E.M., Erhardt G. and the ECONOGENE Consortium. (2005). Null allele at the OarAE129 locus and corresponding allele frequencies in German sheep. *Animal Genetics*, 36: 71–93.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup A. (2004). GENECLASS2: software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95(6): 536-539.

- Rabouam C., Comes A.M., Bretagnolle V., Humbert J.F., Periquet G., Bigot Y. (1999). Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*, v.8, p.493-503.
- Rannala B., Mountain J.L. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 9197-9201.
- Raymond M., Rousset F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249.
- Rousset F., Raymond M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140:1413-1419.
- Saitbekova N., Gaillard C., Obexer-Ruff G., Dolf G. (1999). Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics* 30(1):36-41.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000). Arlequin, ver.2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000. 111p.
- Shalom A., Soller M., Friedmann A. (1993). Dinucleotide repeat polymorphism at the bovine HUU616 locus. *Animal Genetics* 24, 327.
- Shriver, M.D., Jin, L., Boerwinkle, E., Deka, R., Ferrell, R.E., and Chakraborty, R. (1995). A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Mol. Biol. Evol.*, 12(5):914-920.
- Slatkin M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457 - 462.
- Sokal R., Rohlf F.J. (1995). *Biometry*. 3rd edition. W.H. Freeman and Co., New York.
- Sun, G.L., Días, O., Salomón, B., Von Bothmer, R. (1998). Microsatellite variation and its comparison with allozyme and RAPD variation in *Elymus fribrosus* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae). *Hereditas* 129, 275-282.
- Tapio M., Miceikiene I., Vilkki J., Kantanen J. (2003). Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistencies in fragmented breeds. *Molecular Ecology*, 12, 2045-2056.
- Tapio I., Tapio M., Grislis Z., Holm L-E., Jeppsson S., Kantanen J., Miceikiene I., Olsaker I., Viinalass H., Eythorsdottir E. (2005). Unfolding of population structure in Baltic sheep breeds using microsatellite analysis. *Heredity*, 1-9.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lepingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P., Leveziel H., Guerin G. (1994b). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm Genome* 5, 288-297.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lepingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P., Leveziel H., Guerin G. (1994). Conservation of a syntenic group of microsatellite loci between cattle and sheep. *Mammalian Genome* 5, 310-314.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4(3), 535.

- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984). Estimating F – statistics for the analysis of the population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Yang S.; Wang Z., Liu B., Zhang G., Zaho S., Yu M., Fan B., Li M., Xiong T., Li K. (2003). Genetic variation and relationships of eighteen Chinese indigenous pig breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35: 657-671.
- Zabeck T., Nogaj A., Radko A., Nogaj J., Slota E. (2005). Genetic variation of Polish endangered Bilgoraj horses and two common horse breeds in microsatellite loci. *J. Appl. Genet.* 46 (3):299-305.
- .

CAPÍTULO 3

Inferências sobre a origem das principais raças naturalizadas brasileiras de ovinos a partir de marcadores moleculares RFLP-PCR*

Resumo

Estudos independentes da região controle do mtDNA demonstraram que o genoma mitocondrial de *Ovis aries* está dividido em dois grandes haplogrupos, um europeu e outro asiático. Foram analisadas 343 amostras pertencentes a 11 raças de ovinos no Brasil a partir de uma análise de RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*) no gene mitocondrial citocromo oxidase I com a enzima *Hinfl*. Todos os animais apresentaram o haplótipo europeu, exceto dois animais de origem africana da raça Dorper. Os polimorfismos foram confirmados por sequenciamento. A alta frequência do haplogrupo europeu nas ovelhas brasileiras corrobora os eventos históricos de colonização do Brasil, contudo o papel das raças africanas ainda precisa ser melhor investigado. Esse polimorfismo poder ser incluído em futuros programas de seleção assistida por marcadores moleculares, bem como em estudos de clonagem e expressão gênica.

*Parte dos resultados já publicados no periódico Archivos de Zootecnia v.54: 395-399, 2005.

Os ovinos foram introduzidos no Brasil pelos portugueses assim como a grande maioria dos animais domésticos (Mariane *et al.*, 1999). Por motivos sócio-culturais, a criação desses animais foi considerada no Brasil uma atividade de categoria inferior, de modo que foram criados somente para subsistência. Esse descaso, segundo Moraes (2000), fez com que, os produtos brasileiros derivados de ovinos (lã, carne, pele) perdessem competitividade frente aos produtores de outros países. Para que ocorra uma mudança desse cenário, é necessária uma profunda modificação logística de todas as classes envolvidas na produção de ovinos, ou seja, desde o pesquisador até o produtor.

Para conservação dos recursos genéticos é desejável, antes da implantação de qualquer programa de preservação ou manejo, a caracterização dos estoques, bem como a avaliação de suas origens de maneira a agregar o maior número de informações possíveis. Wood & Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998), a partir do sequenciamento da região controle (*D-loop*) do DNA mitocondrial (mtDNA), demonstraram a existência de pelo menos dois grandes haplogrupos na espécie *Ovis aries*, um de origem européia e outro, provavelmente, de origem asiática. Esses resultados também podem ser interpretados como dois eventos de domesticação independentes que ocorreram, um padrão atualmente reconhecido para as espécies domésticas (Bruford *et al.*, 2003). Hiendleder *et al.* (1999), desenvolveram um teste diagnóstico de maneira que esses haplótipos podem ser identificados a partir de uma análise de RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism- Polymerase Chain Reaction*) ao invés de sequenciamento.

O presente trabalho teve como objetivo realizar um teste diagnóstico nas principais raças de ovinos naturalizadas e comerciais brasileiras para identificar suas possíveis origens geográficas a partir de um SNP (single nucleotide polymorphism) no mtDNA.

Foram utilizados 343 indivíduos das raças naturalizadas brasileiras Santa Inês, Bergamácia, Rabo Largo, Morada Nova, Somalis e Crioula Lanada, bem como animais das raças comerciais Corriedale, Hampshire, Ile de France e as raças africanas Damara e Dorper (Tabela 1). O DNA foi extraído dos leucócitos a partir de um protocolo não orgânico modificado de Miller *et al.* (1988). Após a extração e diluição do DNA das amostras, parte do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COXI) foi amplificado, via PCR, em todos os

animais por meio dos *primers*: COIF (5'-GCAGAGTTTGAAGCTGCT-3') e COIR (5'-AGCTGACGTGAAGTAAGC-3') descritos por Hiendleder (1999). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador MJ Research (PTC100) com rotina de amplificação uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5' seguidos por 25 ciclos compostos pelas etapas: a) 30'' a 94°C, b) 1' a 60°C e c) 1' a 72°C. Ao final dos 25 ciclos foi adicionada uma etapa final de 5' a 72°C, para completa extensão dos produtos amplificados.

Tabela 1 - Raças de ovinos utilizadas nas análises de RFLP- PCR, localidades amostradas, suas respectivas siglas e número de animais por localidade.

Raça	Localidade	Sigla	N
Santa Inês	Fazendas Centro Oeste	OSI CO	15
	Fazendas Sergipe	OSI SE	17
	Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE	OSI EM	16
Bergamácia Brasileira	Distrito Federal, Universidade Brasília ¹	OB DF	33
	Fazendas Goiás, GO	OB GO	13
Rabo Largo	EBDA, BA	ORL EB	28
	Juazeiro, BA	ORL JU	20
Morada Nova	Variedade Vermelha, Embrapa Caprinos, CE	OMN VE	23
	Variedade Branca, UFC, CE	OMN BR	25
Somalis Brasileira	Embrapa Caprinos, CE	OS	48
Crioula Lanada	Embrapa Pecuária Sul, RS	OCL	10
Hampshire	Fazendas São Paulo	OH	24
Ile de France	Fazendas São Paulo	OIF	24
Corriedale	Fazenda São Paulo	OC	11
Dorper	EMEPA, Paraíba	ODO	26
Damara	EMEPA, Paraíba	ODA	10
TOTAL			343

¹Animais com origem de RJ, SP e BA.

Depois de amplificados, os fragmentos foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *Hinfl* e analisados em géis de agarose 2,0% contendo brometo de etídeo. Os animais foram classificados como de origem européia caso apresentassem uma mutação (T para C) entre as posições 5562-5566 do mtDNA e de origem asiática caso não apresentassem a referida mutação (Hiendleder *et al.*, 1999). Dessa forma, o padrão Europeu é caracterizado pela presença de duas bandas principais de tamanhos em torno de 477 e 359 pares de bases (pb), enquanto que o padrão asiático é

caracterizado por uma banda de 836 pb. Para a confirmação dos resultados, os produtos de PCR de oito animais escolhidos ao acaso foram sequenciados em um Sequenciador automatico ABI 3700 (Applied Biosystems).

A amplificação do gene COXI gerou uma banda de aproximadamente 1053 pb e os resultados da digestão desse fragmento pela enzima *HinfI* são demonstrados na Figura 1. Apenas dois animais da raça Dorper apresentaram os haplótipos asiáticos. Os resultados do sequenciamento confirmaram as análises de RFLP-PCR, assim como o observado por outros autores (Zhao, 2002). Estes resultados podem parecer previsíveis em razão da colonização histórica dos portugueses no Brasil. Entretanto, é válido ressaltar que as raças brasileiras Rabo Largo, Somalis Brasileira e Morada Nova e até mesmo Santa Inês, tenham provavelmente vindo ou apresentam muita influência de raças da África. Dessa maneira, os dados sugerem que as raças africanas possam apresentar essa história evolutiva em comum com as raças européias pelo compartilhamento do mesmo haplótipo mitocondrial. Relatos históricos acerca da história de migração da espécie *Ovis aries*, relata a dispersão de ovinos asiáticos primeiro para a Europa e por fim para a África (Fitzhugh e Bradford, 1983), o que corrobora em parte com os resultados obtidos.

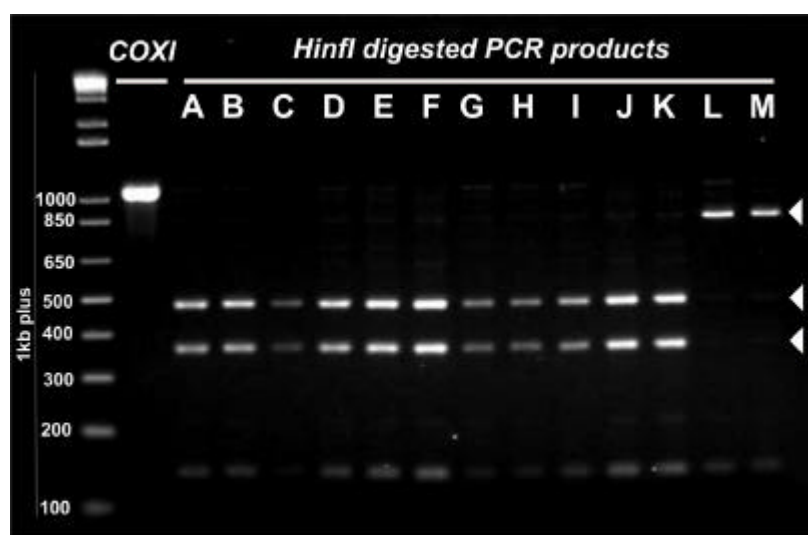


Figura 1 – Gel de agarose 2% evidenciando os padrões de restrição (A-M) de parte do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COXI) com a enzima *HinfI* em 11 raças de ovinos no Brasil. A-K: tipo B ou europeu, bandas diagnósticas de 477 e 359 pb (setas inferiores); L-M: tipo A ou asiático, banda diagnóstica de 836 pb (seta superior). A- Santa Inês; B- Crioula Lanada; C, L e M- Dorper; D- Bergamácia; E- Rabo Largo; F- Morada Nova; G- Somalis; H- Corriedale; I- Hampshire; J- Ile de France; K- Damara.

Uma outra hipótese poderia ser a influência das raças de ovelhas existentes na Ilhas Canárias, visto que praticamente todo navio que vinha para as Américas nos séculos XV e XVI aportava nessas ilhas (Delgado *et al.*, 1998), o que permitia a troca de material genético com ovelhas da Europa, Ásia e África.

A divisão em haplótipos sugere pelo menos dois eventos de domesticação das ovelhas no mundo. A compreensão correta desses eventos de diferenciação dentro das espécies de animais domésticos são de natureza complexa já que envolve processos evolutivos como seleção natural, migração, a seleção artificial exercida pelo homem e processos não seletivos como a deriva genética. Em termos práticos, a existência de animais portadores de genoma mitocondrial asiático no Brasil representa a possibilidade de teste de hipóteses em relação à existência de associações de características de importância econômica ao tipo de genoma mitocondrial existente.

Novos trabalhos estão sendo desenvolvidos para testar as hipóteses aqui propostas, principalmente a partir do sequenciamento da região controle do mtDNA nessas raças aqui estudadas e sua comparação com seqüências de ovelhas do mundo inteiro. Paralelamente, outras classes de marcadores moleculares nucleares (microssatélites) estão sendo empregadas também para oferecerem uma perspectiva diferente da variação mitocondrial. Esses estudos, de uma maneira geral, poderão auxiliar no manejo e conservação das raças naturalizadas brasileiras, sem que haja uma perda maior da estrutura genética de suas populações.

Referências Bibliográficas

- Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4: 900-910.
- Delgado J.V., Fresno M.R., Camacho M.E., Rodero E., Barba C. (1998). Origen e influencias del ovino canario. *Arch. Zootec.*, 47, 511-516.
- Fitzhugh H.A., Bradford G.E. (1983). Hair sheep of Western Africa and the Americas. A genetic resource for the tropics. Winrock International Livestock Research and Training Center, Series. Westview Press. Boulder, Colorado, 317pp.
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y., Lewalski H. (1998) Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral

- maternal sources. No evidence for contributions from Urial and Argali sheep. *Journal of Heredity* 89: 113-120.
- Hiendleder S., Phua S.H., Hecht W. (1999). A diagnostic assay discriminating between two major *Ovis aries* mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 30: 211-213.
- Mariante A. da S., Albuquerque M.S.M., Egito A.A., McManus C. (1999). Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. *Animal Genetic Resources Information, FAO*, 25: 109-123.
- Miller, S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.
- Morais O.R. (2000). O melhoramento genético dos ovinos no Brasil: situação atual e perspectivas para o futuro. In: *Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3º*, Belo Horizonte. *Anais...Belo Horizonte: FEPMVZ*, 266-272.
- Wood N.J., Phua S.H. (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Animal Genetics* 27: 25-33.

CAPÍTULO 4

Estrutura genética de *Ovis aries* no Brasil com base em dados da região-controle do mtDNA

Resumo

Com o objetivo de identificar as relações filogenéticas entre onze raças de ovinos naturalizadas brasileiras e comerciais, foram seqüenciados 588 pares de bases da primeira metade da região controle (CR) do DNA mitocondrial (mtDNA). Trinta-e-cinco haplótipos foram identificados numa amostra de 57 indivíduos, com um valor de diversidade médio de 1,1%. Os valores de AMOVA foram maiores do que com os marcadores nucleares e as raças naturalizadas brasileiras apresentam desvios significativos no teste de neutralidade F_S , sugerindo que uma expansão demográfica das mesmas. As análises haplotípicas indicaram a presença de pelo menos três haplogrupos principais existentes nas raças naturalizadas brasileiras. A raça Crioula Lanada compartilha todos seus haplótipos observados com a Crioula do México e com a raça Corriedale. Todas as raças naturalizadas confirmaram a presença dos haplótipos do tipo B. Análises de network indicaram a complexidade existente para a diferenciação de raças por essa classe de marcadores.

1. Introdução

No período Neolítico os homens desenhavam nas paredes das cavernas os animais que caçava para se alimentar, além de usá-los como vestimenta e utensílios. Quando o homem mudou de habitante das cavernas, que coletava plantas e caçava, para agricultor com moradias estabelecidas ou nômades começou, gradualmente, a selecionar plantas e animais (Pedrosa, *et.al*, 2005). O desenvolvimento da agricultura ocorreu em pelo menos dois principais centros do mundo, um na Ásia, numa região que foi conhecida como Fértil Crescente e um na América. No decorrer desse período foram achados restos de esqueletos de animais que estavam próximos com os dos homens (Hyams, 1972). Assim, alguns pesquisadores acreditam que o início do processo da domesticação animal tenha começado nesta época, há aproximadamente 10.000 a.c.

Hoje, a maioria dos produtos animais de importância para o homem, provém de espécies que foram domesticadas desde este período Neolítico. Segundo Bowman (1974), a domesticação é definida como domar/recuperar um animal ou planta do seu estado selvagem, o que implica também na orientação do seu crescimento, controle do ciclo de vida, reprodução, controle de sua propagação, aproveitamento de seus produtos e serviços para a vantagem e propósito do homem.

Contudo, as espécies domésticas possuem atualmente uma dinâmica populacional e uso muito desigual ao longo do planeta. Dessa forma, poucas raças possuem efetivos e uso enormes, enquanto a grande maioria das raças ou grupos existe em pequenos rebanhos e com uso praticamente nulo na produção animal. Sierra (1998) pondera que a conservação do patrimônio genético nativo, seja animal ou vegetal, pode ser uma das grandes alternativas ligadas a sustentabilidade das sociedades no futuro. Entretanto, para tal cenário acontecer é necessário, entre outros aspectos, um amplo programa de caracterização para que esses recursos sejam avaliados e seu potencial seja conhecido. Uma das estratégias iniciais para implantação de programas desse nível poderia ser estudar a estrutura genética dos rebanhos existentes e fazer a prospecção de genes ou regiões contendo características de interesse econômico. A realização desse tipo de trabalho geralmente pode estar embasada em técnicas moleculares, as quais têm sido consideradas

ferramentas poderosas tanto para identificar os padrões e processos responsáveis pela situação atual dos rebanhos, além de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo e unidades de conservação (Awise, 1994; Moritz, 1994).

Os animais domésticos de produção apresentam complexos padrões filogeográficos, em virtude principalmente do processo de domesticação (seleção artificial) imposto pelo homem a aproximadamente 8.000-10.000 anos atrás no sudoeste asiático (bovinos, suínos, caprinos e ovinos) e no leste asiático (suínos e búfalos) e no oeste da América do Sul (alpacas e lhamas) (Bruford *et al.*, 2003). Essas espécies são caracterizadas por padrões moleculares que indicam expansões demográficas rápidas e recentes que estão associadas diretamente à difusão e aumento significativo dos rebanhos mundiais. Como exemplo do mtDNA, muitos dos haplótipos novos identificados nessas espécies são resultados de mutações recentes pouco divergentes das linhagens principais existentes ao redor do mundo. O alto índice de introgressão entre raças e a facilidade de movimentar animais entre continente pelo ser humano são algumas das explicações que explicam a grande complexidade filogeográfica observada.

Dentre as espécies de animais domésticos, os ovinos são um dos grupos menos conhecidos em termos de variabilidade genética. Contudo, com o início dos resultados dos trabalhos com bovinos nos meados da década de 90, Wood e Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998, 2002) identificaram duas linhagens de mtDNA (região do D-loop) que sugerem pelo menos dois eventos de domesticação das ovelhas modernas, um asiático e um europeu. Atualmente, Guo *et al.* (2005), e Pedrosa *et al.* (2005) identificaram na China e no Leste Europeu, respectivamente, um novo haplogrupo, chamado de C que possivelmente seja o grupo irmão dos restantes. Em vertebrados, as altas taxas mutacionais do D-loop permitem estudos populacionais com divergências recentes. Especificamente na região controle do mtDNA das ovelhas, ocorre uma série variável de repetições em tandem de aproximadamente 75 bases que distinguem linhagens com 2 até 7 blocos em tandem. Esta variação também pode ocorrer no nível individual, caracterizando um evento de heteroplasmia.

Atualmente, a América do Sul é uma das regiões com grande potencial para crescimento da ovinocultura de maneira competitiva frente ao mercado

mundial. Contudo, existe uma série de problemas que vão desde aspectos culturais até os financeiros, que impedem esse avanço. Como forma de iniciar um programa de conservação e melhoramento das raças de ovelhas no Brasil, é necessário, um conhecimento mínimo dos principais padrões de diversidade genética existentes entre e dentro das raças. O objetivo nesse trabalho, especificamente, foi analisar os polimorfismos existentes dentro da região controle do mtDNA dentro e entre as raças naturalizadas de ovinos no Brasil, bem como comparar estas seqüências com os dados disponíveis na literatura e bancos de dados públicos.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem

Para sequenciamento da região controle do mtDNA foram utilizadas as seguintes raças naturalizadas brasileiras: Santa Inês, Bergamácia, Rabo Largo, Morada Nova, Somalis e Crioula Lanada. Como grupos externos para as análises filogenéticas, foram adicionadas as raças comerciais Ile de France, Corriedale e Hampshire. A análise também incluiu as raças Damara e Dorper, originárias da África do Sul e recém introduzidas no Brasil. Os números de animais por raça, siglas e localidade da coleta estão apresentados na Tabela 1. Os indivíduos analisados foram gentilmente cedidos por unidades da Embrapa, órgãos estaduais de pesquisas agropecuárias, universidades e fazendas.

2.2. Extração e quantificação do DNA

Foram coletadas de 5-10 mL de amostras de sangue por meio de punção venosa em fracos vacutainer contendo solução anticoagulante de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,05 M. A partir das amostras de sangue, foram separadas as hemácias, soro e linfócitos por centrifugação. A extração do DNA foi feita utilizando glóbulos brancos. O método de extração escolhido foi segundo um protocolo inorgânico modificado (Miller *et al.*, 1989). Após extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria, com a finalidade de verificar a qualidade do mesmo, e também, por comparação de concentração em géis de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo.

Todo o material foi depositado no banco de DNA do Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGA – Cenargen). O DNA concentrado foi dividido em duas alíquotas, uma delas foi estocada à -80°C e a outra foi estocada em freezer -20°C até o momento das ampliações.

Para as análises, as amostras foram diluídas para uma concentração final de aproximadamente 3 ng/ ul, posteriormente, com a finalidade de uma maior padronização das amostras, as diluições foram verificadas em géis de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo.

Tabela 1. Raças de ovinos, localidades amostradas, número dos indivíduos analisados e número de animais amostrados por localidade (N) utilizados nas análises de sequenciamento da Região Controle do mtDNA.

Raça	Localidade	Haplótipos	N
Santa Inês (OSI)	Fazendas, DF, GO	H39, H41, H51	03
	Fazendas, SE	H38, H39	02
	Fazenda, MA	H46, H51	02
	Fazenda, CE	H53, H55	02
	Embrapa Caprinos, CE	H52, H54	02
Bergamácia Brasileira (OB)	Universidade Brasília ¹ , DF	H38, H39	03
	Fazendas, GO	H37, H40, H41	03
	UNESP, Botucatu, SP	H19, H42	02
Rabo Largo (ORL)	Empresa Estadual Pesquisa Agropecuária Bahia, BA	H39, H41, H46	03
	Fazenda, Juazeiro, BA	H41, H47	02
	Empresa Estadual Pesquisa Agropecuária Paraíba, PB	H41	01
Morada Nova (OMN)	Embrapa Caprinos, CE ²	H45	02
	Universidade Federal Ceará, CE ³	H43, H44	02
Somalis Brasileira (OS)	Embrapa Caprinos, CE	H41, H48 - H50	05
Crioula Lanada (OCL)	Embrapa Pecuária Sul, RS	H16, H19, H25, H30	05
Hampshire (OH)	Fazendas, SP	H31 - H33	03
Ile de France (OIF)	Fazendas, SP	H34 - 36	03
Corriedale (OC)	Fazendas, SP	H16, H29	04
Damara (ODA)	Empresa Estadual Pesquisa Agropecuária Paraíba, PB	H56, H57	04
Dorper (ODO)	Empresa Estadual Pesquisa Agropecuária Paraíba, PB	H58, H59	04
TOTAL			57

¹Animais com origem de RJ, SP e BA; ; ²Variedade Vermelha; ³ Variedade Branca

2.3. Escolha e amplificação dos fragmentos

A região controle (RC) ou D-loop do mtDNA de ovinos possui aproximadamente 1180 pares de base (pb). Para amplificação e sequenciamento dessa região a mesma foi dividida em duas partes, aproximadamente iguais, de 600 pb cada.

Os *primers* utilizados para as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram desenhados de acordo com o sugerido por Wood & Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998) (número de acesso no GenBank AF010406). Foram sintetizados dois *primers* externos que amplificou todo o D-loop e mais um *primer* interno *reverse* usado nas reações de *nested-PCR*. Os *primers* que flanqueiam toda a RC estão localizados nas seqüências que codificam para o RNA transportador da prolina e fenilalanina. A seqüência e código dos *primers* usados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Nome, seqüência e número de bases dos *primers* utilizados para amplificação região da região controle do mtDNA ovino.

Nome	Seqüência (5' – 3')	Número de bases
tRNA – Phe	TCATCTAGGCATTTTCAGTG	20
tRNA – Pro	CTCACCATCAACCCCAAAGC	21
HC2 (nested)	CACGCGGCATGGTGAACAAGCTCG	24

A reação de PCR foi realizada num volume final de 50 uL para cada amostra e cada região do mtDNA. Uma quantidade de DNA suficiente para a reação de sequenciamento foi obtida com 3 reações de 50 uL de volume final para cada amostra. Foi utilizado na PCR, 20mM de Tampão 10X (Tris-HCl, pH 8.4; 50mM KCl), 200mM de dNTP's, 0,4µM de cada *primer*, 3,5mM de MgCl₂, 9ng de DNA, 1,5 unidades de Taq DNA polimerase.

Os fragmentos foram gerados em Termocicladores de diferentes marcas contendo um ciclo inicial de desnaturação de 94 C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 94 C por 1 min, anelamento dos *primers* a 60 C por 1 min, extensão a 72 C por 1 min e uma extensão final dos produtos a 72 C por

10 min. Os produtos das ampliações foram observados em géis de agarose 1,4% corados com brometo de etídeo.

2.4. Purificação da PCR e reação de sequenciamento

Os fragmentos de DNA gerados na PCR foram heterogêneos, principalmente em razão da heteroplasmia e, por esta razão, foram realizadas duas formas de purificação dos mesmos.

Para as amostras que apresentaram a amplificação específica de um fragmento somente, os 150 uL de produto final da PCR foram purificados em colunas de sílica de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante (Promega).

As amostras onde foram observados dois ou mais fragmentos como produto final foram eluídas do gel de agarose 2% e também purificadas com colunas segundo outro protocolo recomendado pelo mesmo fabricante.

Para a primeira metade do D-loop as reações de sequenciamento foram feitas no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, utilizando o kit de sequenciamento BigDye v. 1, seguindo recomendações do protocolo do usuário (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram purificadas segundo pelo protocolo álcool e isopraonol do mesmo fabricante. As amostras depois de purificadas foram re-suspendidas em 25uL de formamida Hi-Di, desnaturadas a 94 C por 5 minutos e imediatamente inseridas no gelo. A eletroforese capilar da primeira metade foi conduzida em um Seqüenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

As reações de sequenciamento da segunda metade do D-loop e algumas da primeira metade foram realizadas na plataforma de sequenciamento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília – DF. Nestas reações foram seguidos os protocolos de amplificação e purificação do manual do usuário do kit BigDye v. 3 (Applied Biosystems). A eletroforese capilar foi conduzida num seqüenciador automático ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems).

2.5. Análise dos dados

Em razão da baixa amostragem experimental e para maior representatividade da análise, foram acrescentadas seqüências do *GenBank* correspondentes à região controle para várias raças de ovinos (Tabela 3). Foram retiradas do *GenBank* amostras que possuíam apenas o haplogrupo B (Europeu), em razão da grande maioria das raças analisadas no Brasil apresentar apenas esse haplogrupo (Capítulo 3).

As seqüências foram alinhadas e editadas com o programa MEGA v.3.0 (Kumar *et al.*, 2004) a partir da seqüência de referência [AF010406], publicada por Hiendleder *et al.*, (1998). Os dados obtidos após o alinhamento das seqüências foram utilizados para vários tipos de análises de maneira a otimizar a informação contida dentro e entre as raças de ovinos estudadas.

Primeiramente, os animais seqüenciados nesse trabalho (Tabela 1) foram divididos em dois grupos: 1) Raças exóticas (N=17): formado por todas as raças lanadas exóticas/ comerciais (OC, OH e OIF) mais as duas raças deslanadas africanas (ODO, ODA) e; 2) Raças naturalizadas (N=39): formado pelas raças lanadas e deslanadas naturalizadas brasileiras (OSI, OB, ORL, OMN, OS, OCL). Um dos animais Dorper (ODO24) pertence ao haplogrupo A e, por isso, não foi utilizado nas análises. Essa divisão em dois grupos é necessária tanto para diminuir os efeitos de baixa amostragem como para responder algumas perguntas importantes: 1) Quantificar o quanto essas raças são diferentes em relação às raças restantes; 2) Verificar a existência de subestrutura de populações; 3) testar se as diferenças observadas entre haplótipos estão de acordo com as expectativas teóricas de populações em expansão preditas pela Teoria Neutra ou se há algum tipo de seleção indireta (*hitchhiking*) sobre a região estudada. Dessa forma, alguns índices de variação de seqüência e estrutura de haplótipos foram estimados, tais como: A) diversidade nucleotídica (π) dentro de cada grupo; B) a distribuição pareada de diferenças haplotípicas (*mismatch distribution*), na qual estima a freqüência do número de diferenças observadas entre pares de haplótipos; análise de variância molecular entre os grupos e; C) Teste de Neutralidade de Fu (1997), para testar se algum dos grupos é caracterizado por mutações recentes e ao mesmo tempo, uma redução dos haplótipos mais generalizados ou basais. Todos os testes foram estimados com o software Arlequin (Schneider *et al.*, 2000).

Tabela 3. Seqüências da região controle de ovelhas domésticas e selvagens obtidas no *Genbank* para auxiliar as análises.

Número de acesso nos bancos de dados	Raça	Origem	Haplótipo*	Referência
AY829406	Texel	Europa	H2	Guo <i>et al.</i> , 2005
AY829407	Texel	Europa	H3	Guo <i>et al.</i> , 2005
AY829381	Polled Dorset	Europa	H4	Guo <i>et al.</i> , 2005
AY829378	Polled Dorset	Europa	H5	Guo <i>et al.</i> , 2005
AY829377	Polled Dorset	Europa	H6	Guo <i>et al.</i> , 2005
AF010406	Merinolandschaf	Alemanha	H1	Hiendleder, <i>et al.</i> , 1998
AF039579	<i>Ovis musimon</i>	Europa	H26	Hiendleder, <i>et al.</i> , 1998
AF039577	Merinolandschaf	Alemanha	H28	Hiendleder, <i>et al.</i> , 1998
AY582820	Crioula	México	H7	Não Publicado
AY582819	Crioula	México	H8	Não Publicado
AY582818	Crioula	México	H9	Não Publicado
AY582817	Crioula	México	H10	Não Publicado
AY582816	Crioula	México	H11	Não Publicado
AY582815	Crioula	México	H12	Não Publicado
AY582814	Crioula	México	H13	Não Publicado
AY582813	Crioula	México	H14	Não Publicado
AY582812	Crioula	México	H15	Não Publicado
AY582811	Crioula	México	H16	Não Publicado
AY582810	Crioula	México	H17	Não Publicado
AY582809	Crioula	México	H18	Não Publicado
AY582808	Crioula	México	H19	Não Publicado
AY582807	Crioula	México	H20	Não Publicado
AY582806	Crioula	México	H21	Não Publicado
AY582805	Crioula	México	H22	Não Publicado
AY582804	Crioula	México	H23	Não Publicado
AY582803	Crioula	México	H24	Não Publicado
AY582802	Crioula	México	H19	Não Publicado
AY582801	Crioula	México	H25	Não Publicado
AY582800	Crioula	México	H25	Não Publicado
L29055	Raça Aragonesa	Espanha	H27	Zardoya, <i>et. al.</i> , 1995

*Resultados deste trabalho; **Haplogrupo A (Asiático).

Em razão de alguns problemas técnicos que os métodos de agrupamento por meio de árvores filogenéticas podem gerar em estudos intra-populacionais (Posada e Crandall, 2001), uma análise de *network* pelo método de vetores medianos foi realizada por meio do software Network 4.1.1.2 (www.fluxus-engineering.com acessado em novembro 2005). Para estimar os haplótipos foi utilizado o software TCS (Clemente *et al.*, 2000). Este tipo de análise considera as predições da teoria da coalescência a qual considera, dentre várias pressuposições, que os haplótipos ancestrais possuem maior freqüência na população estudada e que, geralmente, devem estar mais centralizados do que os haplótipos mais derivados. O algoritmo para a formação da rede de haplótipos é a parcimônia estatística, onde o programa

estima o número máximo de diferenças originadas de substituições únicas entre os haplótipos (ou seja, todas as diferenças que não são resultados de várias substituições em um único sítio) com um intervalo de confiança de 95%. O número obtido é chamado de limite da parcimônia, dessa forma, os haplótipos que diferem em apenas um passo mutacional são agrupados, depois os que diferem em dois, etc. As conexões são realizadas até que todos os haplótipos sejam unidos ou que o limite da parcimônia seja alcançado.

3. Resultados e Discussão

Foi seqüenciado um total de 595 bases da região 5' da Região Controle de *Ovis aries* por pelo menos duas vezes em cada um dos 57 indivíduos distribuídos entre as onze raças citadas. Apenas um desses animais apresentou seqüência característica do haplogrupo Asiático (A) (ODO24) e o restante apresentaram seqüências diagnósticas do haplogrupo Europeu (B). Esses resultados revalidam o teste diagnóstico realizado no capítulo 3. Por meio de eletroforese em géis de agarose a 2% dos produtos de PCR foi observado o fenômeno de heteroplasmia dentro dos indivíduos com uma variação de 3 a 5 repetições de um motivo de 75 pares de bases existente na primeira metade da região controle (resultados não mostrados). Para padronizar as análises foram seqüenciados apenas fragmentos que continham quatro dessas repetições de 75 bases. Na Tabela 4, se encontram os resultados de variabilidade haplotípica e nucleotídica encontrada nos grupos das raças exóticas e naturalizadas.

Os resultados mostram que o grupo das raças exóticas apresentaram um maior número de substituições e, conseqüentemente, uma maior diversidade nucleotídica do que as raças naturalizadas brasileiras. Por outro lado, o teste de Neutralidade de F_S foi significativo para as raças naturalizadas, o que sugere uma recente expansão ou crescimento demográfico da população. Existem outras forças que provocam desvios do equilíbrio da neutralidade (de Brito *et al.*, 2002), contudo como se trata de uma região que não codifica nenhum gene, é de se esperar que os desvios sejam realmente em razão de uma expansão demográfica. Tais desvios fazem sentido visto que o número de haplótipos observados no grupo das raças naturalizadas é quase o dobro do grupo das raças exóticas, sugerindo que todos são extremamente

recentes. Entretanto, tem de levar em consideração o fator amostragem, e por isso esforços de se aumentar a amostragem serão testados em trabalhos futuros.

Tabela 4. Parâmetros da variabilidade do mtDNA dentro grupos selecionados

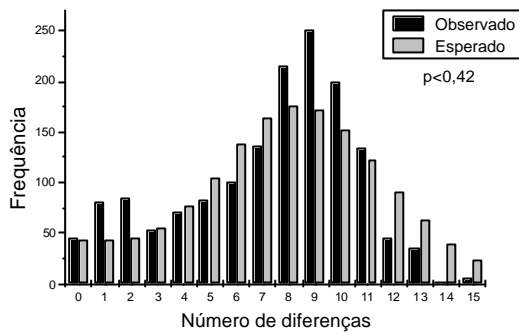
Parâmetros	Raças Exóticas	Raças Naturalizadas
Número de indivíduos	17	39
Número de haplótipos	12	23
Número de substituições	31 (30 TS; 1 TV)*	23 (21 TS; 2TV)
Diversidade nucleotídica (π)	0,0134, +/- 0,0073	0,01040, +/- 0,0056
Teste F_S	-1,8331, $p \leq 0,19920$	-8,539, $p \leq 0,004$

*TS= transição; TV= transversão.

Os valores de π obtidos pelos trabalhos de Wood e Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998) apenas para o haplogrupo B estão semelhantes aos obtidos neste trabalho. Trabalhos recentes como Pedrosa *et al.*, (2005) e Meadows *et al.*, (2005) obtiveram valores menores, contudo, eles utilizaram principalmente a segunda metade da região controle, sabidamente menos variável (Tarbelet *et al.*, 1996). A razão dos trabalhos recentes não sequenciarem mais a primeira metade da RC reside na existência das regiões de 75 pb heteroplásmicas. Entretanto, fica a dúvida se o motivo do não sequenciamento dessa região foi pela dificuldade do sequenciamento em si ou se foi por causa da possível homoplasia que tais elementos podem inserir nas análises. Novamente, nenhum trabalho até o momento provou a influência ou viés dessas regiões nas análises estatísticas em *Ovis aries*.

Foram estimados dois testes para a distribuição pareada de diferenças haplotípicas (*mismatch distribution*). O primeiro foi realizado com todas as seqüências das raças localizadas no Brasil (Figura 1A), e o segundo foi realizado apenas com as raças naturalizadas (Figura 1B). Ambos os testes não foram significativos, o que reforça que os animais passaram por uma recente expansão demográfica (translocação para o Brasil). Isso é claramente visto na Figura 1A que apresenta um claro padrão unimodal, entretanto, as raças brasileiras apresentam uma tendência a um padrão bimodal. Tal fato sugere a estruturação de haplótipos dentro das raças naturalizadas brasileiras.

A



B

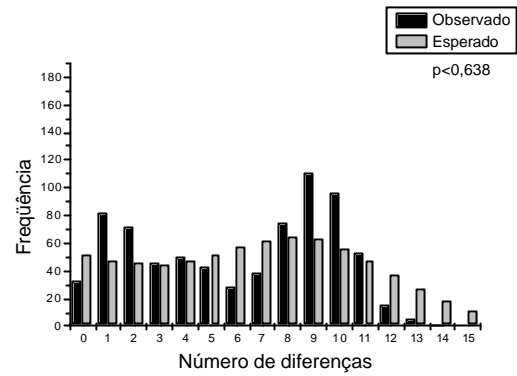


Figura 1. Gráficos de distribuição pareada de diferenças haplotípicas (*mismatch distribution*) entre: A) Todos os animais do haplogrupo B das onze raças analisadas no Brasil; B) Apenas com as seis raças naturalizadas brasileiras.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) também foi realizada de duas formas. Na primeira foram quantificadas as diferenças entre as todas as raças naturalizadas e todas as raças exóticas. No segundo teste foi estimado apenas as diferenças entre as onze raças amostradas no Brasil (Tabela 5).

Para o primeiro teste foi observado que 16, 25% ($p < 0,0001$) da variação total observada foi em razão de diferenças entre as raças comerciais e as raças naturalizadas brasileiras. No segundo teste, foi observado que 28,61% ($p < 0,0001$) de toda a variação observada foi devida a diferenças existentes entre raças. Estes valores relativamente mais altos quando comparados aos marcadores nucleares são totalmente esperados tanto em razão a diferentes taxas de fixação e modos de herança entre esses dois genomas bem como do ponto de vista comportamental/ biológico. Nos animais domésticos, geralmente, o fluxo gênico é mediado pelos machos seja pela prática comum de troca de reprodutores entre fazendas, seja pela compra de sêmen pelas grandes companhias. Como a herança mitocondrial é materna, a introgressão de machos nos rebanhos só irá influenciar o genoma nuclear, aumentando assim a taxa de fixação entre diferentes raças.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) para 56 indivíduos amostrados entre as onze raças de ovinos estudadas no Brasil. Graus de liberdade (gl); soma de quadrados (SQ); componentes de variância (CV).

Fonte de variação	gl	SQ	CV	% Total	P-value
Entre os grupos (Exóticos/ Naturalizados)	1	18,78	0,6561	16,25	< 0,0001
Dentro dos grupos	54	181,354	3,3584	83,75	< 0,0001
Entre as raças	10	80,005	1,0699	28,61	< 0,0001
Dentro das raças	45	120,138	2,6697	71,39	< 0,0001

Antes da análise com as seqüências do *GenBank* pertencentes ao haplogrupo B (Tabela 4), havia 35 haplótipos identificados. Após a adição das mesmas, esse número aumentou para 59 haplótipos identificados. Nas Tabelas 6 e 7 pode-se observar os haplótipos encontrados somente para o Haplogrupo B. De maneira que, a Tabela 6 mostra os próprios haplótipos e a posição específica de seus sítios de substituição observados e, a Tabela 7, mostra as freqüências desses haplótipos em todas as 17 raças analisadas.

Os haplótipos mais freqüentes foram o H16 (haplótipo comum às ovelhas Crioula Mexicana, Crioula Brasileira e Corriedale), H39 e H41 (haplótipo comum para as raças Santa Inês, Bergamácia, Rabo Largo e Somalis Brasileira). A raça Morada Nova foi à única raça naturalizada que apresentou todos seus haplótipos específicos bem como foi possível identificar haplótipos específicos para as variedades Vermelha e Branca, corroborando os resultados obtidos pelos marcadores microssatélites no Capítulo 2, de maneira que estas variedades são grupos que possuem uma variabilidade genética significativamente diferente entre si.

Praticamente todos os haplótipos da Ovelha Crioula Lanada, da raça comercial Corriedale e alguns da raça Bergamácia se agruparam com os haplótipos da ovelha Crioula do México. Esse resultado é a primeira constatação, pelo menos no nível molecular, que todas as ovelhas lanadas chamadas de Crioulas ao longo dos países da América da Latina possuem realmente uma ancestralidade em comum. Este por sua vez, possivelmente deve ser ma raça da Península Ibérica.

Com o intuito de confirmar os resultados das tabelas de haplótipos foi realizado uma análises de Network a partir do software Network (Figura 2). Os resultados obtidos confirmam todas as observações realizadas pelas tabelas

dos haplótipos. Os haplótipos centrais são os mais primitivos (exemplo, H31) e os haplótipos das extremidades são os mais derivados (exemplo, H40). Adicionalmente, a análise de Network sugere que, a partir da amostragem utilizada, existem três eventos independentes de colonização das raças naturalizadas brasileiras. O primeiro (Brasil 1) formado pelos haplótipos H38, 47, 47, 49, 52 e 53. O segundo (Brasil 2) pelos haplótipos H39, 40, 41, 43, 44, 51, 55. O último (Brasil 3), formado principalmente pela raça Crioula Lanada (haplótipos H16, 19, 25, 30). Dentro do Haplogrupo SCO3, existe um haplótipo específico da raça Santa Inês. Tal resultado pode significar uma introgressão recente neste grupo a partir de uma das raças exóticas existentes no Brasil.

Os resultados aqui apresentados sugerem que estudos de variação de seqüência no mtDNA para *Ovis aries* e talvez até mesmo para a grande maioria dos animais domésticos é muito informativo para determinar grandes haplogrupos, isto é, quando as diferenças estão bastante fixadas entre grupos separados por milhares de anos e a distâncias continentais (exemplos, Bradley *et al.*, 1996 em bovinos; Luikart *et al.*, caprinos; Giuffra *et al.*, 2000 em suínos).

Não foi observado um padrão direto para detectar diferenças interraciais, a exceção das variedades de Morada Nova. Estes resultados só reforçam a dificuldade e complexidade que os padrões podem atingir entre os animais domésticos. Contudo, estas análises são importantes para avaliar, pelo menos, quais seriam os haplótipos mais primitivos e derivados existentes numa determinada região ou continente. Tal informação é necessária quando se deseja, por exemplo, importar animais ou rastrear eventos passados de introgressão.

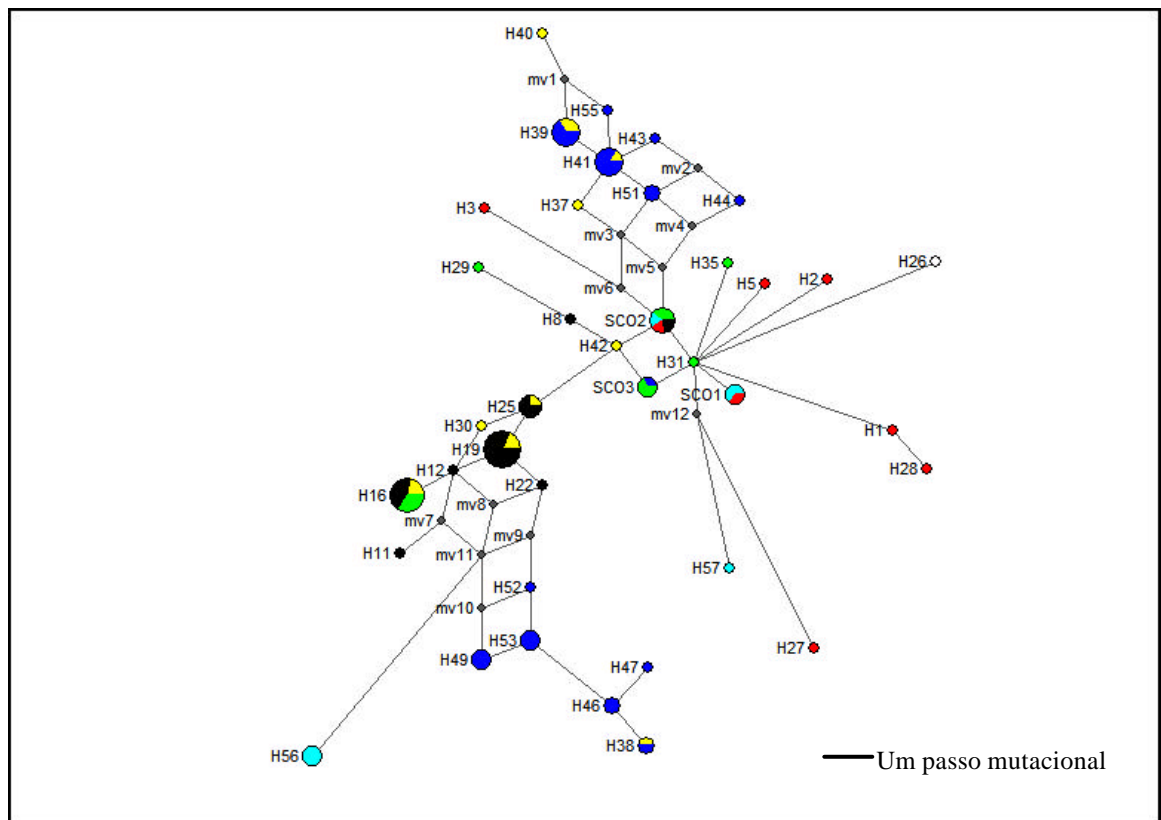


Figura 2. Análise de Network a partir de seqüências de DNA de ovinos da segunda metade da região controle do mtDNA. Cada círculo representa um haplótipo. *mv são os vetores médios que representam haplótipos hipotéticos não amostrados nesse estudo. SCO são haplótipos muito próximos unidos pelo programa para auxiliar visualização. SCO1: H4, H58; SCO2: H34, H6, H7, H32, H59; SCO3: H54, H33, H36.

- Raças naturalizadas deslanadas brasileiras;
- Raças naturalizadas lanadas brasileiras;
- Raças européias;
- Raças Exóticas coletadas Brasil;
- *Ovis musimon*
- Raça Crioula Mexicana;
- Raças africanas coletadas Brasil.

A presença de haplótipos comuns ao longo da América Latina foi um resultado não esperado. Dessa forma, estudos têm de ser intensificados nas raças Ibéricas para identificar realmente quais os possíveis haplótipos fundadores das raças crioulas na América. Novas amostras de Corriedale devem ser analisadas para testar se a presença desse haplótipo não tenha sido em razão de eventos de introgressão com a própria raça Crioula Lanada ainda no Brasil. Tal padrão seria plausível, visto que a raça Corriedale é uma das que apresenta os maiores efetivos no sul do Brasil.

Por último, os resultados do mtDNA corroboraram em parte os resultados com os marcadores nucleares, como por exemplo, a diferenciação das duas variedades de Morada Nova. Entretanto, tais padrões não foram tão evidentes para a raça Santa Inês. Novamente, novas tipagens ou sequenciamentos devem ser realizados para confirmar as hipóteses geradas neste trabalho.

4. Conclusões

A. As raças naturalizadas brasileiras se mostraram em expansão populacional e possuem um maior número de haplótipos do que as raças exóticas/comerciais.

B. Existem pelo menos três haplogrupos do haplogrupo tipo B dentro das ovelhas naturalizadas brasileiras.

C. A ovelha Crioula Lanada brasileira compartilha praticamente todos seus haplótipos com a raça Crioula do México bem como com a raça Hampshire, o que sugere a origem comum das ovelhas crioulas lanadas na América Latina.

D. A análise de network foi efetiva para discriminar os haplótipos, contudo, indivíduos devem ser adicionados para comprovar ou refutar os resultados obtidos.

5. Referências Bibliográficas

- Avise J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, Inc. 511p.
- Bowman J.C. (1974). *An introduction to animal breeding*. Studies in biology, no. 46. Edward Arnold, Londres.
- Bandelt H.P., Foster P., Rohlf A. (1999). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol.Biol.Evol.* 16:37-48.
- Bradley D.G., MacHugh D.E., Cunningham P., Loftus R.T. (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5131–5135.
- Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature* 4, 900-910.

- Clement M., Posada D., Crandall K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659
- de Brito R.A., Manfrin M.H., Sene F.M. (2002). Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 2, 161-171.
- Efron B. (1985). Bootstrap confidence intervals for a class of parametric problems. *Biometrika* 72, 45-58.
- Fu Y-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.
- Giuffra E., Kijas J.M., Amarger V, Carlborg Q, Jeon J.T., and Andersson L, (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154:1785–1791.
- Guo J., Du L.X., Ma Y.A., Guan H.B., Li H.B., Zhao Q.L., Li X., Rao S.Q. (2005). A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics* 36, 331-336
- Hiendleder S., Kaupe B., Wassmuth R., Janke A. (2002). Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *The Royal Society* 269, 893-904.
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y. & Lewalski H. (1998). Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources. No evidence for contributions from Urial and Argali sheep. *Journal of Heredity* 89, 113-120.
- Hyams E. (1972). *Animals in the service of man, 10.000 years of domestication.* J. M. Dent & Sons, Ltd, Londres.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J.D., Bouvet J., Taberlet P. (2001). Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5927–5932.
- Meadows J.R.S., Kantanen K.L.I., Tapio M., Sipos W., Pardeshi V., Gupta V., Calvo J.H., WHAN V., NORRIS B., KIJAS J.W. (2005). Mitochondrial Sequence Reveals High Levels of Gene Flow Between Breeds of Domestic Sheep from Asia and Europe. *Journal of Heredity* 96(5):494–501.
- Miller S.A., Dykes D.D.; Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure for ex-tracting DNA from nucleated cell. *Nuc A Res*, v. 16, p. 1215
- Moritz C. (1994). Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 373-375
- Pedrosa S., Metehan U., Arranz J.J., Gutiérrez-Gil B., Primitivo F.S., Bayón Y. (2005). Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *The Royal Society* 272, 2211-2217.
- Posada D., Crandall K.A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* Vol.18 No.1.

- Schneider S.; Roessli D.; Excoffier L. (2000). Arlequin, ver.2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000. 111p.
- Sierra A.C. (1998). La conservación de los recursos genéticos animales en México. Archivos de Zootecnia 47, 149-152.
- Taberlet P. (1996). The use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. In: Molecular Genetic Approaches in Conservation. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.3-25. Oxford Press University, New York.
- Wood N.J. , Phua S.H. (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. Animal Genetics 27, 25-33.
- Zardoya R., Villalta M., Lopez-Perez M.J., Garrido-Pertierra A., Montoya J. and Bautista J.M. (1995). Nucleotide sequence of the sheep mitochondrial DNA D-loop and its flanking tRNA genes. Curr. Genet. 28 (1), 94-96.

CAPÍTULO 5

Identificação de polimorfismos no cromossomo Y de *Ovis aries* no Brasil

Resumo

Em animais domésticos, o estudo da região Y específica é capaz de prover informações tanto sobre o processo de domesticação como o desenvolvimento e migração das raças. O objetivo desse trabalho foi identificar polimorfismos na região não homóloga do cromossomo Y em dez raças de ovinos brasileiras, tanto naturalizadas como comerciais. Foi seqüenciada a região promotora do gene SRY em 10 animais pertencentes às raças Santa Inês, Bergamácia, Morada Nova, Rabo Largo, Hampshire, Corriedale, Dorper e Damara. Paralelamente, dois microssatélites (INRA189 e INRA24) específicos do cromossomo Y de bovinos foram utilizados nessas mesmas raças. Apenas uma mutação foi encontrada em 559 pb seqüenciados e, a exceção da raça Hampshire, todas as demais raças apresentaram a mutação. Ambos os microssatélites ou não geraram fragmentos específicos em *Ovis aries* (INRA24) ou foram monomórficos em todas as raças estudadas (INRA189). Após o seqüenciamento foi desenvolvido um teste de RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism- Polymerase Chain Reaction*) para tipar o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e verificar sua freqüência ao longo das raças naturalizadas de ovinos do Brasil.

1. Introdução

O cromossomo de Y de mamíferos é composto por duas regiões distintas, a região pseudo-autossômica (PAR) e a região y-específica (MSY). A região pseudo-autossômica corresponde por uma pequena porção do cromossomo Y que apresenta homologia com o cromossomo X e, freqüentemente, está sujeita a recombinação com o cromossomo X durante a meiose. A região y-específica é essencialmente composta por seqüências repetitivas e uma pequena região que codifica para alguns genes que apresentam funções importantes na determinação do sexo e também em processos como espermatogênese, fertilidade do macho e controle do crescimento. Essa região pode ser considerada haplóide em razão de não haver recombinação com o cromossomo X (Liu *et al.*, 2002).

A ausência de recombinação entre a região MSY e o cromossomo X, aliada à complexidade das regiões repetitivas, torna muito difícil o mapeamento genético e físico completo dessa região. Dessa forma, o mapeamento da região y-específica permanece indisponível para a grande maioria dos mamíferos, exceto para humanos e camundongos. Em animais domésticos, o estudo da região Y-específica é capaz de prover informações sobre o processo de domesticação e sobre a o desenvolvimento das raças. Estudos sobre a região y-específica são particularmente importantes em animais domésticos, onde um pequeno número de machos pode contribuir para a formação da raça (Meadows *et al.*, 2004). Estudos envolvendo marcadores yespecíficos podem também auxiliar em questões como sexagem, exclusão de paternidade, e estudos de evolução.

Em ovinos pouco é conhecido sobre a região MSY de maneira que apenas dois genes apresentam seqüências disponíveis nos bancos de dados: SRY e ZFY e até o momento, apenas um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) foi descrito (Meadows *et al.*, 2004). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar polimorfismos na região não homóloga do cromossomo Y em dez raças de ovinos brasileiras.

2. Material e Métodos

Duas estratégias foram adotadas para obtenção de polimorfismos no cromossoma Y: 1) Padronizar as amplificações dos microssatélites bovinos INRA 189 e INRA 124 (Edwards *et al.*, 2001) nas raças ovinas e verificar a possibilidade de serem Y-específicos e polimórficos; 2) Seqüenciar um fragmento do primeiro *exon* do gene SRY (Meadows *et al.*, 2004) em diferentes raças de ovinos naturalizados brasileiras e comerciais.

2.1. Amplificação dos microssatélites

As condições de amplificação para os dois locos foram conduzidas utilizando volume final reação de 20 uL contendo 1,25 mM de *primers*, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 2,0 mM de MgCl₂, 2uL de tampão de reação, 1 unidade de Taq DNA Polimerase e 9 ng de DNA genômico. Os primers utilizados foram: 1) INRA189 (Direto: 5`TTTTGTTTCCCG0TGCTGAG 3` e Reverso: 5`AACCTCGTCTCCTTGTAGCC 3`); 2) INRA24 (Direto: 5`GATCTTTGCAACTGGTTTG 3` e Reverso: 5`AGGACACAGGTCTGACAATG 3`). As reações de PCR foram realizadas em termocicladores das marcas MJ Research, Eppendorf, ou Perkin-Elmer e seguiram a seguinte rotina: O programa consistiu de um passo inicial de desnaturação a 93°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação, compreendendo desnaturação das fitas a 93°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* (55-60°C, dependendo do par de *primers*) por 1 minuto e extensão do fragmento a 72°C por 1 minuto. Ao final, seguiu-se mais um passo de extensão por 5 minutos a 72°C. Após a reação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 2% contendo brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Para a otimização desses locos foram utilizadas amostras tanto de machos como de fêmeas.

2.2. Padronização e Sequenciamento SRY

Para o sequenciamento foram escolhidos ao acaso 10 animais machos das raças Santa Inês, Morada Nova, Rabo Largo, Bergamácia, Hampshire, Corriedale, Dorper e Damara. Todas as amostras pertencem ao banco de DNA

do Laboratório de Genética Animal, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- CENARGEN, Brasília-DF.

Para amplificação dessa região foram utilizados os primers (Direto: CTGCTATGTTTCAGAGTATTG e Reverso: TCAATATTGAACATAAGCGC) descritos previamente por Meadows *et al.*, (2004). As reações de PCR foram conduzidas com o mesmo protocolo descrito acima para os microsatélites, a exceção que a temperatura de anelamento desse fragmento foi de 56°C.

Foram submetidos aproximadamente 150 uL da reação de amplificação (três tubos de 50 uL para cada animal) à eletroforese em gel de agarose a 1,4% contendo brometo de etídeo e visualizados em luz ultravioleta. A banda específica do gene SRY foi isolada e submetida ao procedimento de purificação utilizando um Kit específico e protocolo do fabricante (Promega). Após a purificação, o DNA foi quantificado em gel de agarose a 1%, diluído na concentração de 10 ng/ ul e amostras foram enviadas para a Plataforma de Sequenciamento, localizada também nas dependências da Embrapa CENARGEN, onde foram seqüenciadas em um Seqüenciador Automático ABI Prism 3700 (Applied Biosystems).

2.3. Análises

As seqüências obtidas foram alinhadas e editadas a partir do software MEGA v.3 (Kumar *et al.*, 2004) e a obtenção da enzima de restrição necessária para o desenvolvimento do marcador baseado em RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism- Polymerase Chain Reaction*) foi realizada a partir do programa Webcutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Para auxiliar no alinhamento e edição das seqüências foi utilizada a seqüência AF026566 do Genbank.

3. Resultados e Discussão

Os resultados com os marcadores microsatélites de bovinos mostraram uma alta amplificação de fragmentos espúrios que sugerem um pareamento inespecífico destes *primers* com o genoma ovino. Uma estratégia para contornar o problema foi desenhar novos *primers* específicos a partir das seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para ovinos.

Novos *primers* foram desenhados pelo menos para o loco INRA189 e apesar da melhoria das condições de amplificação, foi observado que esse loco além de monomórfico não foi Y específico nos ovinos em razão de sua amplificação em amostras de fêmeas.

Foram seqüenciados 559 pb da região promotora do gene SRY em 10 animais pertencentes às raças Santa Inês, Bergamácia, Morada Nova, Rabo Largo, Hampshire, Corriedale, Dorper e Damara. Da mesma maneira que Meadows *et al.* (2004), apenas um SNP do tipo transição G-A foi identificado (Figura 1). Entretanto, a mesma foi observada em todas as raças analisadas com exceção da raça Hampshire (Figura 2), que por sua vez, foi idêntica a seqüência do Genbank (AF026566). A análise de restrição dos fragmentos seqüenciados permitiu identificar a endonuclease *Ddel* como diagnóstica para a presença deste SNP. Dessa forma, os futuros esforços serão validar o resultado com a enzima de restrição identificada e tipar um número bem maior de machos para esse SNP identificado a partir de RFLP-PCR.

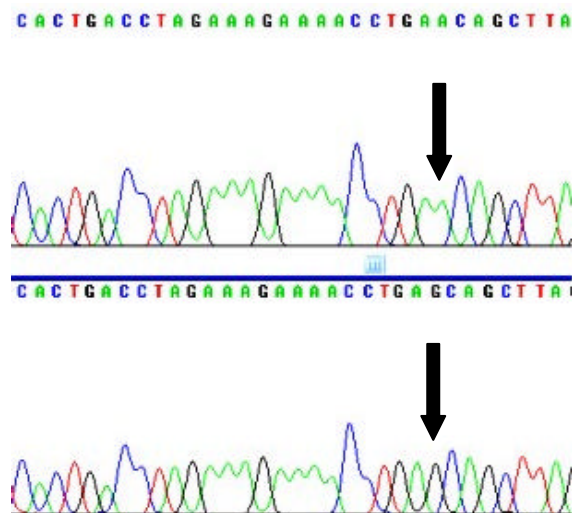


Figura 1. Eletroferograma evidenciando o SNP identificado dentro da região promotora do SRY entre as raças de ovelhas brasileiras. A é um animal da raça Santa Inês e B é um animal da raça Hampshire Down.

AF026566	GTACATTCAA	ATGTTGTATA	ATCAACAATT	GCATGTAGCT	CCAGAATATT	TCACTGACCT	AGAAAGAAAA	[70]
OSI381_P8	[70]
OSI449_P8	[70]
ORL18_P8	[70]
ODO02_P8	[70]
OH08_P8	[70]
ODA02_P8	[70]
OB45_P8	[70]
OMN136_P8	[70]
OSI70_P8	[70]
OC3_P8	[70]
AF026566	CCTGAGCAGC	TTAGCATTTA	CTTCCCATGC	TCCCTCCCTC	TTAATTCATT	CTGGGCAGCC	ATCACTAACT	[140]
OSI381_P8A.....	[140]
OSI449_P8A.....	[140]
ORL18_P8A.....	[140]
ODO02_P8A.....	[140]
OH08_P8A.....	[140]
ODA02_P8A.....	[140]
OB45_P8A.....	[140]
OMN136_P8A.....	[140]
OSI70_P8A.....	[140]
OC3_P8A.....	[140]
AF026566	TGGTCCTTGT	CTCTGCATTT	GCCTTCTCTG	GGGACTTCAC	TTGAACATAA	TCTTTCAGTA	TGTGGCCTGT	[210]
OSI381_P8	[210]
OSI449_P8	[210]
ORL18_P8	[210]
ODO02_P8	[210]
OH08_P8	[210]
ODA02_P8	[210]
OB45_P8	[210]
OMN136_P8	[210]
OSI70_P8	[210]
OC3_P8	[210]
AF026566	TGTCACCAT	TCTTTTTTGC	ACAGGATGAT	GTTTTCAAGG	TTCTTCCACA	TTGCTGAATG	TATCACTTTT	[280]
OSI381_P8	[280]
OSI449_P8	[280]
ORL18_P8	[280]
ODO02_P8	[280]
OH08_P8	[280]
ODA02_P8	[280]
OB45_P8	[280]
OMN136_P8	[280]
OSI70_P8	[280]
OC3_P8	[280]
AF026566	TGTCPTTTAA	TTTCAACITT	GAGAATATAT	GTATTTTCT	CATATATTAA	ACAATTTCTA	GGTTTATAAA	[350]
OSI381_P8	[350]
OSI449_P8	[350]
ORL18_P8	[350]
ODO02_P8	[350]
OH08_P8	[350]
ODA02_P8	[350]
OB45_P8	[350]
OMN136_P8	[350]
OSI70_P8	[350]
OC3_P8	[350]
AF026566	ATCTGCTTTG	TGTATGAGTG	TCATTTAAAC	GTTTGCATCC	ACAGTAAGAT	GCATGTTTTT	AATTGCATCA	[420]
OSI381_P8	[420]
OSI449_P8	[420]
ORL18_P8	[420]
ODO02_P8	[420]
OH08_P8	[420]
ODA02_P8	[420]
OB45_P8	[420]
OMN136_P8	[420]
OSI70_P8	[420]
OC3_P8	[420]
AF026566	AGTAATAATG	TTTTACATT	TTGTTGGAT	CITTAATACT	TAACTTTAAT	GAGTAAGATA	CAACTTACAA	[490]
OSI381_P8	[490]
OSI449_P8	[490]
ORL18_P8	[490]
ODO02_P8	[490]
OH08_P8	[490]
ODA02_P8	[490]
OB45_P8	[490]
OMN136_P8	[490]
OSI70_P8	[490]
OC3_P8	[490]
AF026566	GATTGACACA	TTTGAATGAA	TAAAGTTAGC	CITTTGAAGTT	TCTACTGTCA	TTGTATCATA	AGACATTGC	[559]
OSI381_P8	[559]
OSI449_P8	[559]
ORL18_P8	[559]
ODO02_P8	[559]
OH08_P8	[559]
ODA02_P8	[559]
OB45_P8	[559]
OMN136_P8	[559]
OSI70_P8	[559]
OC3_P8	[559]

Figura 2. Seqüência de 559 da região promotora do gene SRY de *Ovis aries* evidenciando um polimorfismo na posição 76 dessa seqüência. AF026566, seqüência referência do GenBank. OSI=Santa Inês; ORL=Rabo Largo; ODO=Dorper; OH=Hampshire; ODA=Damara; OB=Bergamácia; OMN=Morada Nova; OC=Corriedale.

Tal estratégia é válida para verificar a freqüência desse polimorfismo ao longo das raças naturalizadas de ovinos do Brasil. Associado aos resultados do mtDNA previamente obtidos, esses dados darão base para formulação de hipóteses para origem das raças naturalizadas brasileiras bem como poderão auxiliar na elaboração de planos de manejo e melhoramento dos ovinos no Brasil.

4. Conclusão

A. Nenhum polimorfismo foi obtido com os dois marcadores microssatélites de bovinos.

B. Apenas um SNP foi identificado em 559 pb seqüenciados da região promotora do gene SRY.

C. A partir da enzima de restrição identificada, um teste diagnóstico baseado na técnica de RFLP-PCR foi proposto para tipar uma quantidade maior de machos de todas as raças naturalizadas e comerciais utilizadas neste trabalho.

5. Referências Bibliográficas

Edwards C.J., Gaillard C., Bradley D.G., MacHugh D.E. (2000). Y –Specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Animal Genetics* 31, 127-130.

Kumar S.; Tamura K.; Nei M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: : 150-163.

Liu W.-S., Mariani P., Beattie C. W., Alexander, L., Ponce de León, F.A. (2002) A radiation hybrid map for the bovine Y chromosome. *Mamm.Genome* 13, 320-326

Meadows J.R.S.; Hawken R. J. and. Kijas J. W. (2004). Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome, *Animal Genetics*, 35, 379–385.

CONCLUSÕES GERAIS

1. É imprescindível para um programa de conservação e melhoramento baseado em marcadores moleculares prospectar o máximo de técnicas possíveis, pois cada marcador tem sua especificidade e seus padrões de variação únicos que contam a história evolutiva de um determinado taxa em vários níveis.
2. Os marcadores RAPD podem ser utilizados para diferenciar raças de ovelhas mais não rebanhos.
3. Os marcadores microssatélites foram os mais eficientes para diferenciação de rebanhos dentro de uma mesma raça.
4. O painel de marcadores microssatélites testado pode ser diretamente aplicado para manejo genético de rebanhos, testes de exclusão de paternidade e testes de certificação racial para a grande maioria das raças.
5. O grupo Santa Inês foi o que apresentou os maiores valores de heterozigosidade para vários marcadores, o que reforça sua origem complexa a partir de influências de várias raças e tipos.
6. Os marcadores microssatélites identificaram uma subestruturação recente dos rebanhos de Santa Inês do “alto” Nordeste com os rebanhos do “baixo” Nordeste e Centro–Oeste.
7. Existe um haplogrupo comum entre todas as raças Crioulas lanadas da América do Sul.
8. A raça Morada Nova está estruturada em duas populações ou variedades.
9. Apenas um polimorfismo foi identificado no cromossomo Y.
10. As raças naturalizadas de ovinos brasileiras apresentam, em média, uma variabilidade genética maior do que as raças exóticas/ comerciais existentes no Brasil.
11. A raça Dorper foi a única que apresentou haplogrupo asiático (tipo A) dentre todas as raças analisadas.