



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS (*Ovis aries*) CRIoulos  
NA REGIÃO DO PANTANAL/MS, BRASIL**

**CECÍLIA DE MORAIS CARREIRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO DE 2012**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS (*Ovis aries*) CRIoulos  
NA REGIÃO DO PANTANAL/MS, BRASIL**

**ALUNA: Cecília de Moraes Carreiro**

**ORIENTADOR: Samuel Rezende Paiva**

**CO-ORIENTADORA: Concepta Margaret McManus Pimentel**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 65/2012**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO DE 2012**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CARREIRO, C. M. **Origem e diversidade genética de ovinos (*Ovis aries*) crioulos na região do Pantanal/MS, Brasil.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 66p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

CARREIRO, Cecília de Moraes. **Origem e diversidade genética de ovinos (*Ovis aries*) crioulos na região do Pantanal/MS, Brasil.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012, 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

1. Ovino crioulo. 2. Pantanal. 3. DNA mitocondrial.  
4. Cromossomo Y. 5. Origem. 6. Diversidade genética.  
I. Paiva, S. R. II. Título.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS (*Ovis aries*) CRIoulos  
NA REGIÃO DO PANTANAL/MS, BRASIL**

**CECÍLIA DE MORAIS CARREIRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**APROVADA POR:**

---

**SAMUEL REZENDE PAIVA, Doutor (Embrapa Cenargen)  
(ORIENTADOR) CPF: 078.189.507-37  
e-mail: samuel@cenargen.embrapa.br**

---

**ARTHUR DA SILVA MARIANTE, PhD (Embrapa Cenargen)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 123.483.920-20  
e-mail: mariante@cenargen.embrapa.br**

---

**SANDRA APARECIDA SANTOS, Doutora, (Embrapa Pantanal)  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 067.608.168-11  
e-mail: sasantos@cpap.embrapa.br**

**BRASÍLIA/DF, 09 de MARÇO de 2012**

**Dedico este trabalho a Monalisa... que tão cedo se transformou em anjinho barroco.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, através da Unidade Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio dos funcionários e suporte financeiro através dos projetos de pesquisa da equipe de Recursos Genéticos Animais e pela oportunidade de realizar esta pós-graduação.

Agradeço à Universidade de Brasília, representada por professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais do Departamento de Agronomia e Medicina Veterinária.

Agradeço ao meu orientador, Samuel Rezende Paiva, pela tolerância e por me ensinar a fazer ciência todos os dias.

Agradeço a minha co-orientadora, Connie McManus, pelo apoio e discussão da dissertação.

Agradeço ao Dr. Artur Mariante pelos ensinamentos e por tornar a Embrapa um lugar melhor.

Agradeço à Dra. Sandra Santos pela colaboração e pela participação na banca de avaliação.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética Animal pelas horas de humor e ciência.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal pela ajuda técnica e pessoal.

Agradeço aos amigos, *inclusive* Dani que está no Canadá (de fato).

Agradeço a meus pais, Felipe e Maria Cleide, por serem tão bons exemplos.

Agradeço a meus irmãos, Janaína e Eugênio, por serem meus melhores amigos.

Agradeço a toda minha família espalhada pelo país, em especial, meu tio, Aparecido.

Agradeço a Tulio pela paciência, pela discussão da dissertação e pelo amor.

Agradeço a Deus por poder ser mesmo que haja pedras... ainda.

**O ruim é que a ciência ganha em  
conhecimento mais do que a sociedade  
ganha em sabedoria**

**Isaac Asimov**

## ÍNDICE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	xvii
CAPÍTULO 1 .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	2
1.1 Problemática e Relevância .....	2
1.2 Objetivos .....	6
1.2.1 Objetivo geral.....	6
1.2.2 Objetivos específicos .....	6
1.3 Hipóteses .....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 Definição de Raça e sua Aplicação .....	8
2.2 Ovinos Crioulos.....	9
2.3 Conservação Animal e Ambientes Transitórios .....	11
2.4 Marcadores Moleculares na Conservação Animal.....	12
2.5 Classes de Marcadores Moleculares.....	13
2.5.1 Microssatélites.....	16
2.5.2 Polimorfismo de Base Única.....	17
2.6 Escolha de Marcadores Moleculares .....	18
2.6.1 DNA Mitocondrial .....	18
2.6.2 Cromossomo Y .....	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22
CAPÍTULO 2 – ORIGEM E DIVERSIDADE DA OVELHA CRIOULA NA REGIÃO DO PANTANAL/MS, BRASIL.....	28
RESUMO .....	29
ABSTRACT .....	31



1	INTRODUÇÃO .....	33
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	34
2.1	Amostragem .....	34
2.2	Extração e Quantificação de DNA .....	35
2.3	Amplificação de Fragmentos de DNA .....	36
2.4	Purificação da PCR e Reação de Sequenciamento.....	38
2.5	Genotipagem do microssatélite M18 no cromossomo Y .....	39
2.6	Análise dos Dados .....	39
2.6.1	DNA mitocondrial.....	39
2.6.2	Cromossomo Y .....	42
3	RESULTADOS .....	43
3.1	DNA Mitocondrial .....	43
3.2	Cromossomo Y.....	51
4	DISCUSSÃO .....	53
5	CONCLUSÕES .....	63
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
7	ANEXO A.....	66

## RESUMO

**ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS (*Ovis aries*) CRIoulos NA REGIÃO DO PANTANAL/MS, BRASIL** Cecília de Moraes Carreiro. Samuel Rezende Paiva (orientador).

A conservação de animais domésticos naturalizados é ponto estratégico para a ovinocultura brasileira. Rebanhos de ovinos adaptados a ambientes extremos, como a Caatinga Nordestina e o Pantanal Matogrossense, representam um boa fonte de recurso genético para melhor adaptação de raças comerciais com baixo padrão zootécnico no Brasil. Para a introgressão de características de rebanhos com alta resistência parasitária e alta conversão alimentar, o entendimento e o mapeamento dessas populações nativas são essenciais. Com o objetivo de aumentar os conhecimentos sobre o material genético de ovinos naturalizados, o Laboratório de Genética Animal da Embrapa Cenargen (Brasília/DF) vem realizando estudos com o grupo genético ovino Pantaneiro. Estudos preliminares evidenciam uma maior diversidade genética da população desses ovinos em relação a outras raças naturalizadas. Diante desse fato, o presente estudo analisou dez populações de ovinos Pantaneiros do estado do Mato Grosso do Sul (Brasil) para aprofundar os conhecimentos sobre este grupo genético. A amostragem envolveu animais de rebanhos convencionais e de núcleos de conservação, bem como englobou amostras de ovinos Crioulos para comparação, totalizando 343 amostras. O uso de Crioulos baseou-se na proximidade desses dois grupos. Fenotipicamente, os ovinos Pantaneiros assemelham-se à raça Crioula e esta origem deve ser investigada. Primeiramente, o estudo focou nesta proximidade entre os grupos. Para tal, a identificação de haplótipos por meio de marcadores mitocondriais e nucleares foi feita na tentativa de verificar possíveis

diferenças entre OPT e OCL. Paralelamente também por meio de sequenciamento e genotipagem, observou-se o nível de divergência genética entre as várias populações de ovinos Pantaneiros. Os cálculos de diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica e AMOVA foram realizados para inferir o grau de diferenciação entre os rebanhos OPT analisados. A partir desses dados, será possível desenhar um plano de conservação e manejo deste grupo localmente adaptado à difícil região do Pantanal.

**Palavras-chave:** animais domésticos naturalizados, América Latina, DNA mitocondrial, cromossomo Y.

## ABSTRACT

**ORIGIN AND GENETIC DIVERSITY OF THE CREOLE SHEEP ON THE PANTANAL REGION, BRAZIL.** Cecília de Moraes Carreiro. Samuel Rezende Paiva (advisor).

The conservation of naturalized domestic animals is a strategic point for the Brazilian sheep industry. Flocks of sheep adapted to extreme environments, such as the Northeastern Brazilian *Caatinga* and the Brazilian Wetlands (also known as *Pantanal*) represent a good source of genetic resources to better fit commercial breeds with low standard livestock in Brazil. For introgression of herds characteristics with high parasitic resistance and high feed conversion, understanding and mapping these native populations are essential. Aiming to increase knowledge about the genetic material of naturalized sheep, the *Laboratório de Genética Animal* of *Embrapa Cenargen* (Brasília/DF) has been studying the *Pantaneiro* genetic sheep group. Preliminary studies show a high genetic diversity of the population of sheep in relation to other naturalized breeds. Given this fact, this study analyzed ten *Pantaneiro* sheep populations from *Mato Grosso do Sul* (Brazil) to deepen the knowledge about this genetic group. The sampling involved animals from conventional herds and conservation centers, as well as South American Creole sheep for comparison, totalizing 343 samples. The use of Creole sheep was based on the proximity of these two groups. Phenotypically, *Pantaneiro* sheep resemble the Creole and this source should be investigated. Firstly, this study focused on these groups proximity. For this purpose, the haplotypes identification by mitochondrial and nuclear markers was done in the attempt to determine possible differences between OPT and OCL. Also, by sequencing and genotyping,

the level of genetic divergence among the various OPT populations was observed. Estimates of haplotype diversity, nucleotide diversity and AMOVA were performed to infer the level of differentiation among the analyzed OPT herds. From these data, it will be possible to draw a plan of conservation and management of this group locally adapted to the difficult region of the *Pantanal*.

**Keywords:** naturalized domestic animals, Latin America, mitochondrial DNA, Y chromosome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.1</b> Exemplos do grupo genético crioulo Pantaneiro. Adaptado de Rural Centro (2012). .....	4
<b>Figura 1.2</b> Exemplos dos ecótipos do Ovino Crioulo. A – Fronteira; B – Serrana; C – Zebura; D – Comum. Adaptado de Castro (2008). .....	10
<b>Figura 1.3</b> Representação esquemática do DNA mitocondrial de <i>Ovis aries</i> . As regiões destacadas são usadas para estudos filogenéticos e filogeográficos atuais. D-Loop: região controle; CytB: citocromo B; ND5: NADH desidrogenase 5. Adaptada de Taylor & Turnbull (2005). .....	19
<b>Figura 1.4</b> Representação esquemática de parte do cromossomo Y. MSY: região sexo-específica. ....	21
<b>Figura 2.1</b> Localização das fazendas amostradas. A área de onde foi coletada boa parte das amostras (n = 106 OPT) corresponde a uma única região no Pantanal mato-grossense-do-sul (Nhecolândia) enquanto que as amostras de A são uma coletânea das diferentes regiões pantaneiras. n: número de amostras; OCL: ovino Crioulo; OPT: ovino Pantaneiro. ....	35
<b>Figura 2.2</b> Gel de agarose 1% para verificação do sucesso da PCR da região do DNA mitocondrial correspondente ao gene ND5. ....	43
<b>Figura 2.3</b> Rede <i>Median-Joining</i> (MJ) gerada a partir de 541pb do gene mitocondrial ND5 por meio do programa Network. Os círculos dos haplótipos possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição das mutações que diferem cada haplótipo da sequência do DNA mitocondrial referência. O grupo “Outras OPT” refere-se a todas as fazendas de OPT, exceto, as fazendas Uniderp e Embrapa Pantanal. ....	49
<b>Figura 2.4</b> Rede haplotípica gerada a partir de 541pb do gene mitocondrial ND5 com a presença das sequências depositadas no <i>GenBank</i> e as populações analisadas formando um único grande grupo. Os círculos dos haplótipos possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição das mutações que diferem cada haplótipo da sequência do DNA mitocondrial referência. O grupo OPT refere-se a todas as	

fazendas de OPT analisadas pelo LGA. mv ( <i>median vector</i> ): vetores médios que representam haplótipos hipotéticos não amostrados nesse estudo.....	50
<b>Figura 2.5</b> Gel de agarose 1% para verificação do sucesso das PCRs no cromossomo Y.....	52
<b>Figura A.1</b> Dendrograma obtido com algoritmo <i>Neighbor joining</i> a partir da matriz de número de alelos compartilhados entre 46 animais do grupo genético crioulo do Pantanal. Números entre os nós correspondem a valores de consistência interna ( <i>bootstrap</i> ). Nota-se que a maior parte dos animais, que foi agrupada por microssatélites em dois grandes grupos, estruturou-se também em dois grupos distintos de haplótipos por ND5 (H1/H2 e H3). SL = Santa Luzia; FB = Baía das Pedras; FN = Guaçuzinho; FR = Rancharia; SL = Santa Luzia; SJ = São Joaquim; CA = Campo Alto; BV = Firme. Adaptado de Paiva e colaboradores (2008). .....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Comparação entre alguns marcadores moleculares de DNA.....	15
<b>Tabela 2.1</b> Locais de coleta em diferentes fazendas, região, tempo em que os rebanhos estão fechados, tipo de material biológico coletado, número de indivíduos amostrados (n) e sexo das amostras do grupo genético ovino crioulo na região do Pantanal. ....	34
<b>Tabela 2.2</b> <i>Primers</i> usados nas reações de PCR. ....	37
<b>Tabela 2.3</b> Número de acesso das sequências de <i>Ovis aries</i> obtidas no <i>GenBank</i> para análises comparativas ao grupo ovino Pantaneiro. Os haplótipos (H) descritos correspondem às análises realizadas neste trabalho. ....	41
<b>Tabela 2.4</b> Agrupamentos realizados para análises de divergência genética e análise de variância molecular.....	42
<b>Tabela 2.5</b> Tabela de haplótipos baseados no marcador mitocondrial ND5. Os seis haplótipos identificados neste estudo (H1-H6) foram comparados à sequência referência e às sequências depositadas no <i>GenBank</i> .....	46
<b>Tabela 2.6</b> Tabela de divergência genética gerada através do programa DNAsp de acordo com o agrupamento I. ....	47
<b>Tabela 2.7</b> Tabela de divergência genética gerada através do programa DNAsp de acordo com o agrupamento II.....	47
<b>Tabela 2.8</b> Análise de variância molecular das populações analisadas a partir do marcador ND5. Para maiores detalhes dos contrastes, ver Tabela 2.4.....	48
<b>Tabela 2.9</b> Haplótipos montados a partir da associação de dois marcadores do cromossomo Y. ....	52



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- ♀ = fêmea  
 ♂ = macho  
 ® = marca registrada  
**AMOVA** = análise de variância molecular  
**Anhanguera-Uniderp** = Universidade Anhanguera para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal  
**BdP** = fazenda Baía das Pedras  
**BV** = fazenda Bela Vista  
**CA** = fazenda Campo Alto  
**Cenargen** = Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
**ChrY** = cromossomo Y  
**CTAB** = detergente catiônico brometo de cetil-trimetilamônio  
**CytB** = citocromo B  
**DF** = Distrito Federal  
**D-Loop** = região controle do DNA mitocondrial  
**DNA** = ácido desoxirribonucléico  
**dNTP** = desoxirribonucleotídeo trifosfato  
**EDTA** = ácido etilenodiamino tetracético  
**Embrapa** = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
**EP** = fazenda Embrapa Pantanal  
**Exo** = exonuclease I  
**F** = fazenda Firme  
**FAO/UN** = Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura  
**F<sub>ST</sub>** = índice de fixação entre indivíduos de populações diferentes  
**g** = força centrífuga relativa  
**G** = fazenda Guaçuzinho  
**h** = diversidade haplotípica  
**H** = haplótipo  
**HCl** = ácido clorídrico  
**Hi-Di** = formamida  
**Kb** = quilo pares de bases (1.000 pares de bases)  
**KCl** = cloreto de potássio  
**LGA** = Laboratório de Genética Animal  
**M18** = marcador de parte da região não recombinante do cromossomo Y  
**mA** = miliampère  
**Mb** = mega pares de bases (1.000.000 pares de bases)  
**MgCl<sub>2</sub>** = cloreto de magnésio  
**ml** = mililitro  
**mM** = milimolar  
**MS** = Mato Grosso do Sul  
**MSY** = região sexo-específica do cromossomo Y

**mtDNA** = DNA mitocondrial  
**n** = número amostral  
**ND5** = NADH desidrogenase 5  
**ng** = nanograma  
**OCL** = ovino Crioulo  
**OPT** = ovino Pantaneiro  
**p** = teste de significância  
**pb** = par(es) de base  
**PCR** = reação em cadeia da polimerase  
 **$\pi$**  = diversidade nucleotídica  
**R** = fazenda Rancharia  
**RAPD** = DNA polimórfico amplificado ao acaso  
**RFLP** = polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição  
**RNA** = ácido ribonucléico  
**ROX** = carboxi-X-rodamina  
**SAP** = fosfatase alcalina de camarão  
**SJ** = fazenda São Joaquim  
**SL** = fazenda Santa Luzia  
**SNP** = polimorfismo de base única  
**SRY** = região sexo-específica do cromossomo Y  
**SSR** = sequência simples repetida  
**STR** = repetição curta em *tandem*  
**Taq** = *Thermus aquaticus*  
**TBE** = tris-borato-EDTA  
**U** = unidade  
**U** (nas tabelas) = fazenda Uniderp  
 **$\mu$ l** = microlitro  
 **$\mu$ M** = micromolar  
**UV** = raio ultravioleta  
**V** = voltagem  
**VNTR** = número variável de repetições em *tandem*  
**ZFY** = dedo de zinco do cromossomo Y

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Problemática e Relevância

Pequenos ruminantes domesticados (caprinos e ovinos) foram introduzidos no Brasil com a colonização portuguesa no século XVI. Consequentemente, a maior contribuição genética, ainda hoje, é de raças originárias da Península Ibérica (Mariane *et al.*, 1999). Outra importante fonte genética de pequenos ruminantes no Brasil é de animais africanos trazidos em navios negreiros. Estudos de DNA mitocondrial (mtDNA) confirmam que boa parte dos animais transportados eram fêmeas para fornecer leite durante a viagem (Alandia Robles *et al.*, 2006). Além de portugueses, espanhóis e africanos, o Brasil recebeu vários outros povos que trouxeram várias de suas raças e sua tecnologia de manejo reprodutivo (Porter, 1996; Anjos & Farias, 2005). Os holandeses trouxeram ainda animais de lugares distantes, como Índia, ou mesmo animais cruzados (de Almeida Ribeiro, 1997; Quadros, 2005).

Após algumas modificações adaptativas sofridas nas várias colônias ao longo do país, estes animais trazidos pelos colonizadores passaram a ser considerados locais, sendo denominadas raças crioulas, localmente adaptadas ou naturalizadas. Tais grupos genéticos apresentam alto grau de adaptação ao meio no qual se desenvolveram, conferindo-lhes características específicas e vantajosas em relação a raças comerciais (Mariane *et al.*, 1999). No Nordeste, tem-se como exemplo a raça caprina Moxotó que é adaptada ao calor e à escassez de alimentos e apresenta boa produção de carne e couro (Silva & Araújo, 1999; Nascimento *et al.*, 2010). Já no Sul, a raça ovina Crioula (OCL) adaptou-se muito bem às condições de temperaturas extremas e apresenta boa produção de lã (Vaz, 2000) e resistência a parasitas gastrointestinais quando comparada a raças comerciais (Amarante & Amarante, 2003; Bricarello *et al.*, 2004).

Atualmente, o Brasil tem outras fontes de variabilidade genética de pequenos ruminantes como os animais introduzidos a partir do século XX, os quais são denominados raças comerciais especializadas ou exóticas. Tem-se como exemplos a raça Suffolk com boa aptidão para carne, amplamente utilizada em todo o Brasil, e a raça caprina Anglo Nubiana, com sua aptidão para leite, que tem sido vastamente utilizada no Nordeste (Sousa, 2002; Monte *et al.*, 2007).

No entanto, a introdução destas raças exóticas pode oferecer um risco à variabilidade genética do rebanho naturalizado brasileiro. Por modismo e/ou por escassez de programas de conservação eficientes, várias raças naturalizadas já estão em risco de extinção devido a cruzamentos absorventes indiscriminados com animais de raças exóticas/modernas que passaram a ser importadas (Morais, 2001; McManus *et al.*, 2011). Portanto, a necessidade de caracterização e conservação das raças naturalizadas brasileiras torna-se essencial, já que as tendências mudam e os rebanhos conservados podem ser usados em cruzamentos absorventes, recuperando esta variabilidade genética e aumentando o potencial zootécnico da ovinocultura brasileira.

Além de uma simples tendência conservacionista, um exemplo deste cenário transitório são as mudanças climáticas. A produção animal tem sido afetada por condições adversas atuais como chuvas torrenciais em curtos períodos e temperaturas extremas em regiões não habituais. Isto torna os solos mais pobres e a pecuária mais dispendiosa (McMichael *et al.*, 2007). Caso animais de alta exigência sejam colocados nestes ambientes de condições extremas, seus potenciais zootécnicos, provavelmente, serão subaproveitados (McManus *et al.*, 2011). Diferentemente, alguns animais locais já se apresentam adaptados a ambientes aparentemente desfavoráveis como o Sertão Nordestino ou a Região Serrana do Sul. Sendo assim, conservar estes animais localmente adaptados é um recurso alternativo frente às alterações recentes do meio ambiente.

Deste modo, para melhor preservar raças e/ou grupos raciais brasileiros, a equipe do Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGA, Embrapa Cenargen, Brasília/DF), em colaboração com várias Unidades da Embrapa, Universidades e Empresas Estaduais de Pesquisa, vem realizando estudos com diversos grupos genéticos caprinos e ovinos. Uma nova investigação tem sido direcionada ao ecótipo ou grupo crioulo do Pantanal (Ovino Pantaneiro – OPT), um grupo genético de ovinos sem raça definida típico do Pantanal.

O interesse por este grupo surgiu a partir do conhecimento de outras espécies já bem adaptadas ao ambiente alagado do Pantanal Brasileiro. Um exemplo clássico é o cavalo Pantaneiro que, apesar das constantes cheias, não apresenta problemas de podridão do casco, o que seria esperado em outras raças de cavalos criadas nessas condições. Outra característica notória desta raça é a alta resistência a endoparasitas (Santos, 2005b). Tendo por base essas características, espera-se melhor entender o grupo crioulo do Pantanal com base em parâmetros genéticos.

Neste sentido, inicialmente uma parceria entre a Embrapa e a Universidade Anhanguera para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (Anhanguera-Uniderp) foi estabelecida. Na Anhanguera-Uniderp, Campo Grande/MS, encontra-se o Centro Tecnológico em Ovinocultura que desenvolve estudos com o grupo crioulo do Pantanal. Seus resultados preliminares já evidenciaram características desejáveis nas fêmeas como boas habilidade materna e adaptação ao ambiente. Outra característica já comprovada é a alta resistência a endoparasitas, particularidade vantajosa em rebanhos comerciais (Frazilio, 2005; Santos, 2005a).



**Figura 1.1** Exemplos do grupo genético crioulo Pantaneiro. Adaptado de Rural Centro (2012).

Estudos anteriores da equipe do LGA realizados com o rebanho da Anhanguera-Uniderp sugeriram que os animais crioulos do Pantanal podem ser considerados um grupo genético muito mais similar às raças naturalizadas de ovinos que as raças comerciais no Brasil (Paiva & Pimentel, 2007; Paiva *et al.*, 2008). Este fato é de extrema relevância para prosseguir com os estudos deste grupo genético. Dessa forma, o presente estudo analisou as amostras de ovinos Pantaneiros do rebanho da Anhanguera-Uniderp juntamente a amostras coletadas em outras localidades do Pantanal.

Foram analisadas várias regiões do mtDNA ovino (Taberlet, 1996; Hiendleder *et al.*, 1998; Meadows *et al.*, 2004) na tentativa de determinar a origem de OPT através da linhagem materna. A escolha do gene mitocondrial NADH Desidrogenase 5 (ND5) baseou-se em estudos independentes que apontaram a possibilidade de sua aplicação em OPT (Tserenbataa *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2010). Polimorfismos observados em ND5 mostraram-se eficientes para a diferenciação de animais da raça Crioula das variedades, não oficializadas, Serrana – comum em Santa Catarina – e Fronteira – comum no Rio Grande do Sul (Gonçalves *et al.*, 2010).

A origem e a diversidade foram avaliadas também por meio do ChrY, já que a região Y-específica (*Male-Specific region of the Y chromosome* – MSY) fornece informações das linhagens paternas tanto sobre o processo de domesticação como o desenvolvimento e migração das raças. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar haplótipos existentes (Meadows & Kijas, 2009) na região não homóloga do ChrY no grupo crioulo do Pantanal, bem como ampliar os conhecimentos sobre tal cromossomo em ovinos.

Portanto, este estudo teve como foco investigar se existe diferença significativa entre o grupo crioulo do Pantanal e as raças naturalizadas brasileiras, em especial a raça Crioula do Sul do Brasil, bem como testar a homogeneidade entre diferentes rebanhos de OPT. Os resultados desta investigação serão de grande importância para subsidiar, inicialmente, programas de conservação e, posteriormente, programas de melhoramento, visando aumentar a competitividade da ovinocultura brasileira.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Analisar a origem e a diversidade genética de rebanhos do grupo genético de ovinos crioulos localizados na região do Pantanal/MS (Brasil) de forma a subsidiar o uso desse recurso genético totalmente adaptado a condições ambientais próprias do Pantanal.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

a) Quantificar a diversidade genética do grupo genético ovino crioulo do Pantanal, amostrado em diferentes localidades do Pantanal, por marcadores genômicos e mitocondriais;

b) Avaliar se o ovino crioulo do Pantanal diferencia-se de raças ovinas naturalizadas brasileiras a partir de comparações com a raça Crioula do Sul;

c) Ampliar o Banco de DNA estratégico com amostras do ovino crioulo do Pantanal.



### 1.3 Hipóteses

Para avaliar a origem e a diversidade do grupo crioulo do Pantanal, foram feitas análises comparativas com a raça Crioula do Sul. A hipótese nula deste trabalho é que o grupo genético Pantaneiro não é diferente da raça Crioula predominante na Região Sul do país. A hipótese nula do estudo sobre a origem de OPT é a de que a formação dos ovinos adaptados ao Pantanal não seja diferente da genealogia de ovinos naturalizados brasileiros. Assim, OPT teria origem mista com maior influência de ovinos europeus.

Outra questão levantada é a diversidade dentro do grupo OPT. A hipótese nula sugerida é que não existem diferenças significativas entre as várias populações no grupo ovino Pantaneiro de forma que elas podem ser consideradas uma única grande população.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Definição de Raça e sua Aplicação

Caracterizar e delimitar seres vivos em espécies tornaram-se tarefas mais precisas com o auxílio dos marcadores moleculares de DNA desenvolvidos a partir dos anos de 1970 (Avisé, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Porém, tal tarefa ainda se mantém incerta quando se trata da caracterização de raças. O próprio termo “raça” pode variar bastante de acordo com a área do conhecimento, como a Biologia, a Zootecnia e a Sociologia.

Dentro da Biologia, raça recebe algumas conceituações clássicas. Para Mayr (Mayr & Reichardt, 1977), raça é um grupo taxonômico, ou seja, é a subdivisão de uma espécie que geralmente surge por isolamento geográfico. Já de acordo com Futuyma (1992), raça é um conjunto de populações ocupando uma região particular que difere em uma ou mais características das populações de outras regiões, frequentemente equivalente à subespécie.

Na Zootecnia, a definição mais aplicada de raça está relacionada ao conjunto de animais com características morfológicas comuns, agrupados em função de sua aptidão produtiva (carne, lã, leite e/ou pele), área geográfica de exploração e da situação sócio-econômica (Santiago, 1975). Assim, raça refere-se a animais domésticos que, pela seleção humana, passam a ter similaridades que são transmitidas para seus descendentes.

Segundo a definição da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO/UN*), raça é um grupo sub-específico de uma espécie com características externas exclusivas, porém sem isolamento completo em termos genéticos. Animais de uma determinada raça passam, então, a ser fortemente definidos por sua origem geográfica e cultural (FAO, 2004). Portanto, uma definição bastante ampla que engloba questões humanas além do rebanho em si, dificultando ainda mais estudos relacionados à caracterização e ao aproveitamento produtivo de cada raça.

Diante de tantas definições, percebe-se que a classificação de raça ainda é, de fato, algo complexo e, principalmente, subjetivo. Deste modo, o estudo de caracterização de

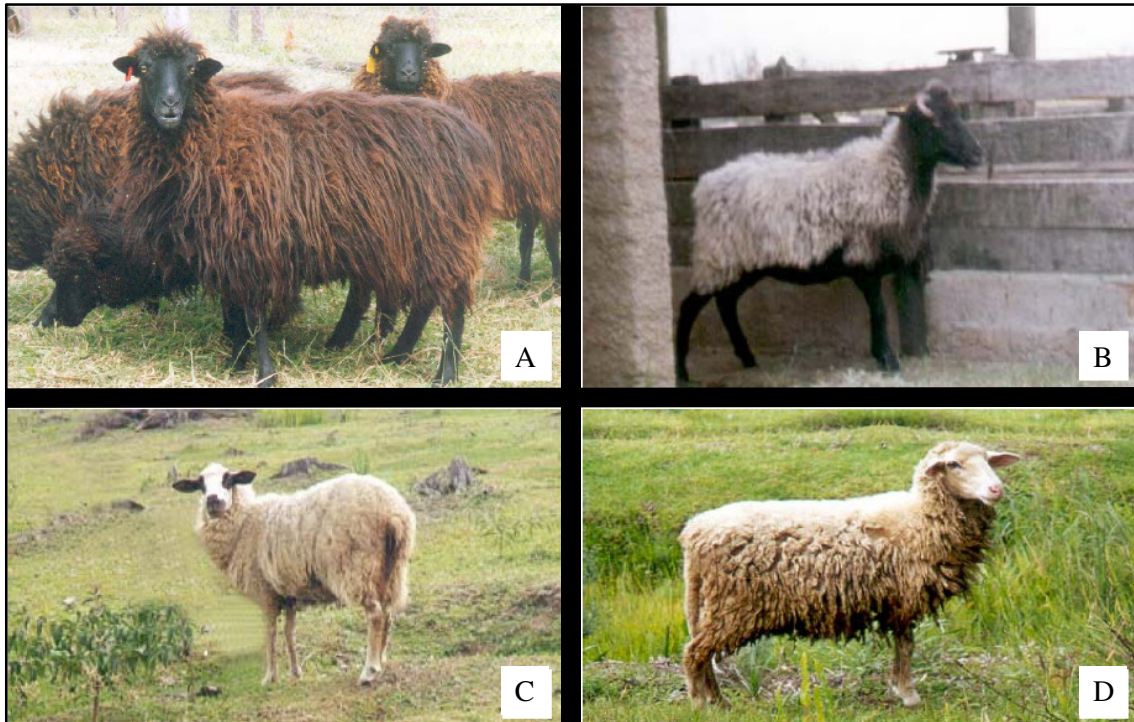
raças torna-se uma atividade árdua que requer várias análises. A aplicação de amplas ferramentas moleculares e estatísticas pode auxiliar nesta tarefa (Brito & Edwards, 2009).

Apesar dessa imprecisão, a delimitação das raças de animais comerciais tem recebido especial atenção da FAO e de outros órgãos em todo o mundo, já que conforme o conceito acima, estes animais fazem parte da cultura de cada povo, devendo ser respeitada e conservada (FAO, 2004). Na Europa, a certificação de produtos locais de origem animal tem ajudado na manutenção da cultura local, bem como tem gerado dividendos importantes para regiões sem muitas oportunidades (FAO, 2004; Ajmone-Marsan, 2011).

## 2.2 Ovinos Crioulos

Os animais domésticos trazidos à América Latina pelos colonizadores europeus, que se modificaram após gerações, receberam a denominação de crioulo de forma geral. Entre os ovinos no Brasil, o processo foi semelhante. Alguns desses animais foram levados ao Rio Grande do Sul no século XVII (Vaz *et al.*, 1999) e passaram por várias adaptações ao ambiente típico da região. Ao longo das gerações, esses animais modificaram-se e começaram a constituir um novo grupo, as ovelhas Crioulas do Sul do Brasil (OCL). Além do próprio nome da raça, as características fenotípicas comprovam que sua origem está relacionada com ovinos vindos da Península Ibérica devido às semelhanças.

Atualmente, a então aceita raça OCL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Portaria nº 38 de janeiro de 2001), é composta por quatro subgrupos, ou ecótipos: Fronteira, Serrana, Zebura e Comum (Vaz *et al.*, 1999). Destes quatro, apenas Fronteira e Serrana são oficialmente reconhecidos pelo MAPA. O ecótipo Fronteira (Figura 1.2 A) tem sua maior ocorrência na região da fronteira do Brasil com Argentina e Uruguai. Esse ecótipo é reconhecido como o padrão oficial da raça OCL. A outra variedade, Serrana (Figura 1.2 B), é predominante na região do norte do Rio Grande do Sul e o Planalto de Santa Catarina. Além das diferenças fenotípicas, o sistema de criação da Fronteira é extensivo com controle e época de acasalamento enquanto que a Serrana é mantida em regime semi-intensivo ou intensivo sem controle de acasalamento.



**Figura 1.2** Exemplos dos ecótipos do Ovino Crioulo. A – Fronteira; B – Serrana; C – Zebura; D – Comum. Adaptado de Castro (2008).

Os ecótipos mais distantes são a ovelha Zebura e a Comum. O ecótipo Zebura, ou Ovelha de Jacó, era encontrado, principalmente, no Paraná e, atualmente, não está mais presente no Rio Grande do Sul. Os migrantes levaram-na para o Mato Grosso do Sul e esse ecótipo apresenta, então, várias alterações fenotípicas atuais em relação à Fronteira e à Serrana (Castro, 2008). O subgrupo Comum pode receber vários nomes como: Pé Duro, Ovelha de Presépio, Ovelha da Bíblia ou Ordinária. É o ecótipo de menor tamanho e também a menos frequente, encontrada apenas no Paraná.

Por causa do relativo fluxo desses animais na região sul do Brasil conduzido pelos migrantes e pela proximidade fenotípica, acredita-se que o grupo genético ovino Pantaneiro (OPT) seja originário de OCL. É possível, inclusive pelo histórico migratório, que OPT seja o ecótipo Zebura (Figuras 1.1 e 1.2). Entretanto, deve-se levar em consideração relatos dos produtores que, recentemente, têm acasalado OPT com a raça Bergamácia a tal ponto que fenotipicamente são próximas. Estudos têm sido conduzidos para caracterizar os OPTs (Jacinto *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2008), definir sua origem e determinar se OPTs já se diferenciaram de OCLs ao ponto de receberem o status de raça e não apenas um ecótipo (Paiva *et al.*, 2008).

### 2.3 Conservação Animal e Ambientes Transitórios

Além de aspectos culturais, a conservação de animais domésticos torna-se ferramenta essencial para lidar com possíveis alterações relacionadas à indústria de produtos de origem animal. Ultimamente, tem-se visto mudanças radicais na postura dos consumidores e mesmo nas condições de produção.

Cada vez mais, a preferência do mercado tem sido por produtos menos calóricos e que agridam menos o meio ambiente. A procura pelo suíno *light*, ou seja, uma carne com menos teor de gordura, fez com que a Embrapa Suínos e Aves desenvolvesse pesquisas com este fim em contraposição à tradicional carne gorda suína. Porém, o produto alcançou um ponto tão “magro” que os pesquisadores tiveram que utilizar animais de linhagens mais “gordas” para retomar a palatabilidade do produto suíno (Fávero *et al.*, 2011). Animais esses que continham genes para a maior porcentagem de gordura intramuscular e hipodérmica. Caso esse material genético não tivesse sido conservado, mesmo que por razões unicamente conservacionistas, em animais naturalizados, a pesquisa poderia ter se perdido simplesmente porque o produto final não agradou os consumidores. Assim, verifica-se a importância da manutenção da diversidade genética de animais domésticos, sendo essa refletida em seus diferentes tipos e raças.

Também, as recentes mudanças climáticas dos últimos 20 anos estão alterando o manejo agropecuário já consolidado em diversos locais. Eventos como repentinos períodos de alagamento intercalados com longos períodos de seca e temperaturas extremas ao longo do ano afetam a produção de alimentos e a criação de rebanhos (McMichael *et al.*, 2007). Animais domésticos que passaram por intenso melhoramento genético são, em geral, mais sensíveis a mudanças climáticas. Dessa maneira, animais especializados apresentam maior dificuldade de se adaptarem a condições adversas do que raças/grupos locais que não passaram por esquemas de seleção intensa por diversas gerações. (McManus *et al.*, 2011). Como citado anteriormente, os animais trazidos pelos colonizadores e que se adaptaram à região alagada do Pantanal Brasileiro são exemplos de recurso genético capaz de lidar com as mudanças climáticas extremas.

Deve-se, no entanto, tomar cuidado em relação a generalizações. Raças de animais domésticos, como a Santa Inês, apresentam uma maior susceptibilidade a parasitas gastrointestinais contudo são menos tolerantes ao calor que outros grupos genéticos (McManus *et al.*, 2009; Castanheira *et al.*, 2010). Desta forma, verifica-se que estudos voltados especificamente às raças locais devem ser conduzidos para a tomada de decisões de manejo e/ou conservação, otimizando a escolha da melhor raça a cada situação (Paiva *et al.*, 2011).

#### **2.4 Marcadores Moleculares na Conservação Animal**

Vários estudos têm sido conduzidos para entender e aproveitar a diversidade genética dos rebanhos brasileiros. Em especial, pesquisas preliminares têm sido realizadas para o desenvolvimento do grande potencial da ovinocultura no Brasil. Paiva (2005) realizou uma série de análises com marcadores moleculares de mtDNA e ChrY dentro e entre as raças naturalizadas e comerciais de ovinos no Brasil a partir de dados disponíveis na literatura e bancos de dados públicos. Mais especificamente, Paiva e colaboradores (2008) verificaram que um dos rebanhos de ovinos Pantaneiros apresentou uma razoável variabilidade genética quando comparado com outros rebanhos de ovinos já avaliados pela equipe LGA. Este mesmo estudo ainda comprovou a possibilidade de realizar uma avaliação mais criteriosa, visando tanto auxiliar no manejo genético deste rebanho como subsidiar a criação de um Banco de Germoplasma deste recurso genético adaptado às condições ambientais do Pantanal e do Centro Sul Brasileiro.

Outros dois estudos, que envolveram a raça ovina Crioula (ecótipos Fronteira e Serrana), foram conduzidos para verificar se havia diferenças entre seus ecótipos. Castro (2008) analisou os rebanhos a partir de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD*) e microssatélites autossômicos. Os dados mostraram que os grupos que formam o rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul são geneticamente diferentes dos animais encontrados no Planalto de Santa Catarina. Em 2010, Gonçalves e colaboradores conseguiram diferenciar as populações desses mesmos ovinos por

meio de polimorfismo de base única (*single nucleotide polymorphism* – SNP) localizados no DNA mitocondrial.

Tais pesquisas têm por base as análises filogeográficas e filogenéticas por meio de marcadores genéticos (Lynch & Milligan, 1994; Fritsch & Rieseberg, 1996; Mace *et al.*, 1996; Heithaus & Laushman, 1997; Haig, 1998). Estabelecer os processos que correspondem à distribuição das espécies e entender a relação e a distância entre os organismos, sejam eles espécies, raças ou populações, têm sido facilitados pelo uso destas ferramentas moleculares (Brito & Edwards, 2009). Em pesquisas de origem e diversidade, existem alguns marcadores de predileção como, por exemplo, os já citados microssatélites e SNPs. A escolha depende de uma série de fatores, sendo o foco de cada pesquisa um dos mais relevantes.

## 2.5 Classes de Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares de DNA são etiquetas desenhadas a partir de regiões que apresentam qualquer variação entre organismos, ou seja, regiões polimórficas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Para que sejam aplicáveis à ciência, os marcadores precisam ter alto nível de polimorfismo, estabilidade em diferentes ambientes, detectar grande número de *loci* não ligados e ser de herança mendeliana (Matioli & Passos-Bueno, 2001). Os marcadores moleculares de DNA podem ser divididos em aleatórios, gene-alvo, sequência específica ou funcionais. Marcadores aleatórios são gerados ao acaso a partir de sítios polimórficos ao longo do genoma. Marcadores gene-alvo são derivados de polimorfismos dentro dos genes. Marcadores de sequência específica são feitos a partir de sequências-molde, gerando iniciadores (*primers*) específicos para uma dada região. Por fim, marcadores funcionais são derivados de sítios polimórficos dentro de genes envolvidos em determinada variação fenotípica (Andersen & Lübberstedt, 2003).

Tais marcadores podem ainda ser classificados de acordo com a metodologia aplicada, seja por hibridização com sondas de sequência conhecida, seja por amplificação do DNA. Alguns exemplos de marcadores por hibridização são Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP; Botstein *et al.*, 1980) e minissatélites (*Variable Number of Tandem Repeats* – VNTR; Jeffreys *et al.*,

1985). Como exemplos de marcadores identificados por amplificação, têm-se Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic* – RAPD; Williams *et al.*, 1990), microssatélites (*Simple Sequence Repeats* – SSR; Litt & Luty, 1989), Polimorfismo de Base Única (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP; Brumfield *et al.*, 2003) e DNA Mitocondrial (mtDNA; Avise, 2000).

Verifica-se assim que a tecnologia de marcadores moleculares tem evoluído ao longo do tempo. Nos anos 70, o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante permitiu o isolamento de fragmentos de DNA específicos ao ponto do sequenciamento completo de um genoma ter sido realizado ainda em 1977 (Sanger *et al.*, 1977). Entretanto, as técnicas disponíveis tornavam a atividade cara e trabalhosa. À medida que os conhecimentos sobre a molécula de DNA têm sido ampliados, as investigações filogenética e filogeográfica têm sido refinadas por meio de microssatélites, RAPDs, SNPs e os atuais sequenciamentos automáticos. Na Tabela 1.1, encontram-se os principais marcadores genéticos e suas características.



Tabela 1.1 Comparação entre alguns marcadores moleculares de DNA.

<b>Marcador</b>	<b>Técnica</b>	<b>Custo</b>	<b>Dados</b>	<b>Herança</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Desvantagem</b>
RAPD e derivados	Fácil	Baixo	Muito rápido	Dominante	Variabilidade genética	Baixo custo, grande número de marcadores	Falta de homologia, dominância, baixa reprodutibilidade, difícil automação, difícil análise e estudos comparativos
Microsatélites	Fácil	Médio	Rápido	Codominante	Origem, filogenia, variabilidade genética, paternidade, certificação racial	Alta informatividade, baixo viés por amostragem, fácil isolamento, baixo custo	Busca dos <i>primers</i> para PCR, alta taxa de mutação, complexos padrões de mutação, baixa abundância, difícil automação, difícil para estudos comparativos
SNPs	Difícil	Médio	Médio	Codominante	Origem, filogenia, variabilidade genética	Baixa taxa de mutação, abundância, variedade de abordagens analíticas, automação, facilidade de estudos comparativos	Diferenças de heterogeneidade entre sítios, isolamento caro, viés por amostragem, baixo conteúdo informativo por SNP
Sequenciamentos	Difícil	Alto	Baixo	Variável	Origem, filogenia, variabilidade genética	A mais alta definição, sem viés, facilidade de estudos comparativos	Interpretação dos resultados, custo

### 2.5.1 Microssatélites

Os marcadores microssatélites representam regiões com sequências de 1-6 nucleotídeos repetidas em *tandem* ao acaso pelo genoma. Dentre suas características, tem-se que são marcadores codominantes, apresentam alto polimorfismo e heterozigosidade, riqueza de alelos por *locus*, o mais elevado conteúdo informativo dentre os marcadores moleculares e, em geral, são neutros por ocorrerem em regiões não codificantes. Sua metodologia é de fácil execução, passível de automação, apresenta baixo custo e alta transferibilidade (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Tais marcadores têm sido usados em vários estudos com ovinos para análises de divergência genética de populações, testes de paternidade e certificação racial (Arranz *et al.*, 1998; Diéz-Tascón *et al.*, 2000; Ramey II *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007).

Algumas de suas limitações estão relacionadas à relativa dificuldade de identificação alélica em alguns casos. Os microssatélites apresentam regiões flanqueadoras únicas e os *primers* são especificamente desenhados para reconhecê-las. Porém, estas regiões também estão sujeitas a mutações. A consequência de tal evento é que esses microssatélites não são amplificados na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), gerando alelos nulos ou silenciosos. Isto dificulta a identificação de heterozigotos. Outra desvantagem é quando há homoplasia, ou seja, a presença de alelos idênticos (Jarne & Lagoda, 1996). Também, deve-se considerar seus processos mutacionais que estabelecem complexos padrões, dificultando as análises (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Nelson *et al.*, 2001).

### 2.5.2 Polimorfismo de Base Única

Os marcadores SNP são baseados em variações que ocorrem em apenas um nucleotídeo ao longo do genoma. Desta forma, são a unidade do polimorfismo de DNA em si. Os SNPs podem acontecer tanto em regiões codantes como não codantes. Essas variações de base única são, em geral, bialélicas e, assim, podem ser facilmente analisadas, possibilitando a construção de árvores populacionais diretamente das frequências de SNPs ou estimar parâmetros demográficos. Seu uso também pode ser aplicado a classificação e agrupamentos. Uma de suas vantagens em relação a microssatélites é a frequência com que os SNPs aparecem, ou seja, determinando um mapa gênico muito mais denso. Outras de suas vantagens são um padrão simples de variação, abundância, fácil automação e potencial para análise em larga escala. Sua característica mais importante é a baixa taxa de mutação ( $10^{-8}$  a  $10^{-9}$ ), por isso, apresentando baixo nível de homoplasia. Com isso, a aplicação de SNPs facilita estudos comparativos para determinar origem, filogenia e variabilidade genética (Schlötterer, 2004; Brito & Edwards, 2009).

Em relação a suas desvantagens, os SNPs podem estar localizados em sítios hipervariáveis, que, nesta situação, violam a característica de serem bialélicos. Comparativamente a marcadores microssatélites, os SNPs apresentam custos mais elevados para prospecção e um baixo polimorfismo devido à existência apenas em dois alelos, já que a chance de uma nova mutação é rara (Brito & Edwards, 2009). Além dessas questões, o uso de marcadores SNPs deve levar em consideração a substancial taxa de heterogeneidade entre sítios, o baixo conteúdo informativo de um único SNP e possíveis vieses devido à amostragem (Schlötterer, 2004).

## 2.6 Escolha de Marcadores Moleculares

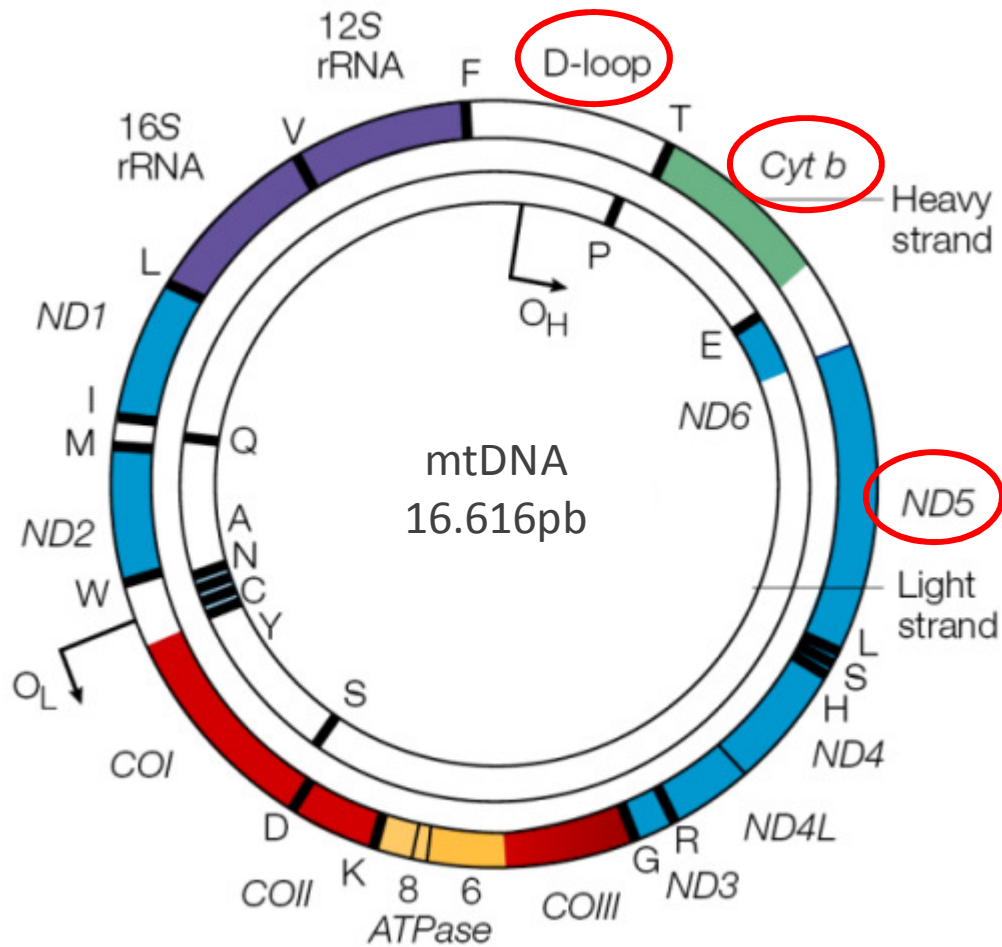
O uso de marcadores genéticos é fortemente influenciado pelo foco da análise em questão, bem como pela escolha do *locus* investigado. Estudos com animais domésticos têm utilizado marcadores genéticos, como o mtDNA e o ChrY, para entender os diferentes padrões de manejo. Por causa dos diversos objetivos de produção (carne e leite), rebanhos convencionais têm números desiguais de machos e fêmeas (Ramalho *et al.*, 2000). Os padrões de dispersão conduzidos pelos homens resultaram em funções diferentes para machos e fêmeas no estabelecimento e na manutenção da estrutura genética dessas populações (Petit *et al.*, 2002). Como consequência, as linhagens maternas e paternas devem ser consideradas em análises de origem e variabilidade genética de animais domésticos.

### 2.6.1 DNA Mitocondrial

A influência materna nas diferentes populações tem sido analisada por meio de marcadores no DNA mitocondrial (Awise, 1994; Taberlet, 1996; Awise, 2000). Estudos sobre genética de populações e evolução foram bastante influenciados pela descoberta do mtDNA como marcador molecular desde os anos de 1970 (Awise *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1979). O uso do mtDNA para estudos populacionais tem ocorrido devido a características que o diferenciam do DNA nuclear. Além do fato da herança desse material genético ser materna em geral, o mtDNA possui alta taxa mutacional (cinco a dez vezes maior que o DNA nuclear), abundância de cópias por célula, alta taxa evolutiva e ausência de recombinação (Brown, George & Wilson, 1979; Harrison, 1989; Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003).

O mtDNA é uma molécula pequena que varia entre 14-26Kb, de acordo com a espécie, e possui um conteúdo gênico amplamente conservado (Billington & Hebert, 1991).

Seu conteúdo gênico está dividido em treze genes codantes de proteína, dois genes de RNA ribossômico, 22 genes de RNA transportador e a região controle (D-Loop). Em *Ovis aries*, estudos revelaram que o mtDNA possui 16.616 pares de base (pb; Figura 1.2), alocando a espécie em cinco grandes haplogrupos (Zardoya *et al.*, 1995; Wood & Phua, 1996; Hiendleder *et al.*, 1998; Meadows *et al.*, 2007).



**Figura 1.3** Representação esquemática do DNA mitocondrial de *Ovis aries*. As regiões destacadas são usadas para estudos filogenéticos e filogeográficos atuais. D-Loop: região controle; CytB: citocromo B; ND5: NADH desidrogenase 5. Adaptada de Taylor & Turnbull (2005).

Devido à cadeia respiratória, a mitocôndria está altamente suscetível à ação das espécies reativas de oxigênio – radicais livres – (Fridovich, 1978), em especial, seu material genético que possui poucos mecanismos de reparo. Assim, a maioria das mutações em mtDNA é caracterizada por substituição de bases. Tais substituições podem ser classificadas em transição, com trocas entre pirimidinas ou purinas, e transversão, com trocas entre

pirimidinas e purinas (Broughton & Dowling, 1994). Portanto, essa vulnerabilidade associada às características intrínsecas do mtDNA torna essa molécula um marcador de escolha para análises de variação genética inter e intra populacional (Brito & Edwards, 2009).

Vários trabalhos têm usado o mtDNA para resolver questões de delimitação de espécies, unidades evolutivas e outros aspectos filogenéticos (Moritz & Brown, 1987; Hiendleder *et al.*, 1998). O sequenciamento mitocondrial tem elucidado a complexidade e a origem, principalmente, de rebanhos de animais domésticos como em suínos (Larson *et al.*, 2005) e caprinos (Joshi *et al.*, 2004; Sardina *et al.*, 2006). Estudos com ovinos demonstram também que a domesticação ocorreu não só no Crescente Fértil, como teorizado inicialmente (Ryder, 1984). O processo de domesticação deu-se em outras regiões, como Ásia, Europa e Pacífico, reveladas pelos novos clados maternos (Wood & Phua, 1996; Hiendleder *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2005; Pedrosa *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006). Tais análises são possíveis por causa das características do mtDNA descritas que permitem uma diferenciação mais fina entre populações.

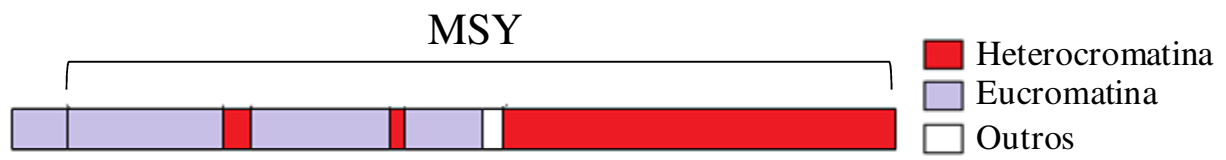
### **2.6.2 Cromossomo Y**

Em relação a estudos da linhagem paterna, vários trabalhos utilizam marcadores no ChrY (Edwards *et al.*, 2000; Hanotte *et al.*, 2000; Hurles & Jobling, 2001). Por ser de herança exclusivamente paterna, ChrY tem sido usado em estudos que tentam entender a influência de algumas poucas linhagens sobre a formação de populações. Alguns exemplos de aplicação do ChrY são para testes de paternidade, migração, evolução (Butler, 2003), domesticação e desenvolvimento de raças (Meadows, Hawken & Kijas, 2004).

O cromossomo Y é um dos menores cromossomos com aproximadamente 60Mb (Figura 1.3). Cerca de 24Mb encontra-se na região da eucromatina e cerca de 30Mb na região da heterocromatina, totalizando 95% de todo o cromossomo como região não recombinante ou sexo-específica, MSY (Butler, 2003). Pelo fato de ter um região que não recombina, ChrY está sujeito a um maior número de mutações, inclusive deleções e inserções. Isso o torna bastante informativo e, conseqüentemente, uma ferramenta muito útil na

formação de haplótipos. Já foi possível identificar em humanos mais de 40 repetições curtas em *tandem* (*Short Tandem Repeats* – STRs) e 220 SNPs (Jobling, 2001).

Em ovinos, infelizmente, as informações sobre ChrY são escassas. Na região MSY, foram descritos cinco genes e, até o momento, apenas um SNP é conhecido (Meadows, Hawken & Kijas, 2004) na região promotora-5' do gene SRY. Porém, mesmo com poucas informações para essa espécie, Meadows e colaboradores já identificaram 17 haplótipos, o que aponta o potencial do estudo desse cromossomo em análises filogenéticas e filogeográficas (Meadows & Kijas, 2009).



**Figura 1.4** Representação esquemática de parte do cromossomo Y. MSY: região sexo-específica.

Portanto, verifica-se que, para entender e manter a diversidade genética de uma dada espécie, muitos estudos são necessários. Manter tal diversidade torna-se importante não apenas por questões ecológicas, mas também no sentido de utilização destes recursos genéticos para a produção animal. A variabilidade genética é essencial para manter a capacidade adaptativa de uma espécie, tal como ampla capacidade produtiva, resistência a doenças e eventos ambientais. Para tal, estudos filogenéticos podem favorecer a conservação das espécies (Primack & Rodrigues, 2001).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJMONE-MARSAN, P. "Use of Molecular Information for the Characterization and Conservation of Farm Animal Genetic Resources: Results of Large Scale International Projects and Perspectives Offered by New Technologies." 8° Global Conference on the Conservation of Animal Genetic Resources. Tekirdag, Turquia, 2011. 85.
- ALANDIA ROBLES, E.; GALL, C.; VALLE ZÁRATE, A. Global Gene Flow in Goats. **A. Valle Zárate** (2006).
- AMARANTE, A.F.T; AMARANTE, M.R.V. Breeding Sheep for Resistance to Nematode Infections. **Journal of animal veterinary advances** 2 (2003): 147-161.
- ANDERSEN, J.R.; LÜBBERSTEDT, T. Functional Markers in Plants. **Trends in plant science** 8.11 (2003): 554-60.
- ANJOS, G.C.B.; FARIAS, A.S.D. "O Fortalecimento Da Cadeia Da Caprinocultura Como Instrumento De Desenvolvimento E Geração De Renda: Um Estudo De Caso No Município De Monteiro/Pb. ." XXV ENEGEP - Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Porto Alegre, 2005.
- ARRANZ, J.J.; BAYÓN, Y.; PRIMITIVO, F.S. Differentiation among Spanish Sheep Breeds Using Microsatellites. **Genetics Selection Evolution** 33.5 (2001): 1-14.
- ARRANZ, J.J.; BAYÓN, Y.; PRIMITIVO, F.S. Genetic Relationships among Spanish Sheep Using Microsatellites. **Animal Genetics** 29.6 (1998): 435-40.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Springer, 1994.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard Univ Pr, 2000.
- AVISE, J.C.; GIBLIN-DAVIDSON, C.; LAERM, J. *et al.*, Mitochondrial DNA Clones and Matriarchal Phylogeny within and among Geographic Populations of the Pocket Gopher, *Geomys Pinetis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 76.12 (1979): 6694.
- BILLINGTON, N.; HEBERT, P.D.N. Mitochondrial DNA Diversity in Fishes and Its Implications for Introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 48.S1 (1991): 80-94.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. *et al.*, Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American journal of human genetics** 32.3 (1980): 314.
- BRICARELLO, P.A.; GENNARI, S.M.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. *et al.* Worm Burden and Immunological Responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. **Small ruminant research** 51 (2004): 75-83.



- BRITO, P.H.; EDWARDS, S.V. Multilocus Phylogeography and Phylogenetics Using Sequence-Based Markers. **Genetica** 135.3 (2009): 439-55.
- BROUGHTON, R.E.; DOWLING, T.E. Length Variation in Mitochondrial DNA of the Minnow *Cyprinella spiloptera*. **Genetics** 138.1 (1994): 179.
- BROWN, W.M.; GEORGE, M.; WILSON, A.C. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 76.4 (1979): 1967.
- BRUMFIELD, R.T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D.A. *et al.*, The Utility of Single Nucleotide Polymorphisms in Inferences of Population History. **Trends in Ecology & Evolution** 18.5 (2003): 249-56.
- BUTLER, J.M. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. **Analysis** 15.91 (2003).
- CASTANHEIRA, M.; PAIVA, S.R.; LOUVANDINI, H. *et al.*, Use of Heat Tolerance Traits in Discriminating Between Groups of Sheep in Central Brazil. **Tropical Animal Health Production** 42 (2010): 1821-1828.
- CASTRO, S.T.R. Diversidade E Estrutura Genética De Ovinos Crioulos Lanados Do Brasil. (2008).
- DE ALMEIDA RIBEIRO, S.D. **Caprinocultura: Criação Racional De Caprinos**. Nobel, 1997.
- DIÉZ-TASCÓN, C.; LITTLEJOHN, R.; ALMEIDA, P. *et al.*, Genetic Variation within the Merino Sheep Breed: Analysis of Closely Related Populations Using Microsatellites. **Animal Genetics** 31.4 (2000): 243-51.
- EDWARDS, C.J.; GAILLARD, C.; BRADLEY, D.G. *et al.*, Y-Specific Microsatellite Polymorphisms in a Range of Bovid Species. **Animal Genetics** 31.2 (2000): 127-30.
- FAO. **Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans Measurement of Domestic Animal Diversity (Modad): Recommended Microsatellite Markers New Microsatellite Marker Sets -Recommendations of Joint Isag/Fao Standing Committee**. ISAG, 2004.
- FÁVERO, J.A.; DE FIGUEIREDO, E.A.P.; IRGANG, R. *et al.*, Evolução Da Genética: Do "Porco Tipo Banha" Ao Suíno Light. In: **Sonho, Desafio E Tecnologia: 35 Anos De Contribuições Da Embrapa Suínos E Aves**. Eds. J.C.P.V.B. Souza, *et al.*, Concórdia: Embrapa, 2011.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução Ao Uso De Marcadores Moleculares Em Análise Genética**. Brasília: Embrapa, 1998.
- FRAZILIO, F.O. **Perfil Das Proteínas Séricas E Da Contagem Leucocitária Em Ovinos Com Infecção Helmíntica Naturalmente Adquirida**. . f. 48. Mestrado em Produção e Gestão Agroindustrial, Universidade para o desenvolvimento do estado e da região do Pantanal, 2005.
- FRIDOVICH, I. The Biology of Oxygen Radicals. **Science** 201.4359 (1978): 875.
- FRITSCH, P.; RIESEBERG, L.H. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA (Rapl) in Conservation Genetics. **Molecular genetic approaches in conservation** 1996 (1996): 54-73.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1992.
- GONÇALVES, G.L.; MOREIRA, G.R.P.; FREITAS, T.R.O. *et al.*, Mitochondrial and Nuclear DNA Analyses Reveal Population Differentiation in Brazilian Creole Sheep. **Animal Genetics** 41.3 (2010): 308-10.
- GUO, J.; DU, L.X.; MA, Y.H. *et al.*, A Novel Maternal Lineage Revealed in Sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics** 36.4 (2005): 331-36.

- HAIG, S.M. Molecular Contributions to Conservation. **Ecology** 79.2 (1998): 413-25.
- HANOTTE, O.; TAWAH, C.L.; BRADLEY, D.G. *et al.*, 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** 9.4 (2000): 387-96.
- HARRISON, R.G. Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. **Trends in Ecology & Evolution** 4.1 (1989): 6-11.
- HEITHAUS, M.R.; LAUSHMAN, R.H. Genetic Variation and Conservation of Stream Fishes: Influence of Ecology, Life History, and Water Quality. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 54.8 (1997): 1822-36.
- HIENDLEDER, S.; MAINZ, K.; PLANTE, Y. *et al.*, 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** 89.2 (1998): 113.
- HURLES, M.E.; JOBLING, M.A. Haploid Chromosomes in Molecular Ecology: Lessons from the Human Y. **Molecular ecology** 10.7 (2001): 1599-613.
- JACINTO, M.A.C.; VARGAS, F.M.J.; MARTINS, C.F. *et al.*, Influence of Genotype on the Quality of Sheep Leather. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40.8 (2011): 1830-1836.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from Molecules to Populations and Back. **Trends in Ecology & Evolution** 11.10 (1996): 424-29.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "Minisatellite" Regions in Human DNA. **Nature** 314.6006 (1985): 67-73.
- JOBLING, M.A. Y-Chromosomal Snp Haplotype Diversity in Forensic Analysis. **Forensic science international** 118.2 (2001): 158-62.
- JOSHI, M.B.; ROUT, P.K.; MANDAL, A.K. *et al.*, Phylogeography and Origin of Indian Domestic Goats. **Molecular Biology and Evolution** 21.3 (2004): 454-62.
- LARSON, G.; DOBNEY, K.; ALBARELLA, U. *et al.*, Worldwide Phylogeography of Wild Boar Reveals Multiple Centers of Pig Domestication. **Science** 307.5715 (2005): 1618.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A Hypervariable Microsatellite Revealed by in Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. **American journal of human genetics** 44.3 (1989): 397.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of Population Genetic Structure with Rapid Markers. **Molecular ecology** 3.2 (1994): 91-99.
- MACE, G.M.; SMITH, T.B.; BRUFORD, M.W. *et al.*, An Overview of the Issues. **Molecular genetic approaches in conservation** (1996): 3-21.
- MARIANTE, A.D.S.; ALBUQUERQUE, M.; DO EGITO, A.A. *et al.*, Advances in the Brazilian Animal Genetic Resources Conservation Programme. **Animal Genetic Resources Information** 25 (1999): 107-22.
- MARTINS, C.F.; VARGAS, F.M.J.; PINTO, G.S. *et al.*, Aspectos Reprodutivos da Ovelhas Nativa Sul-Mato-Grossense. 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras, 2008.
- MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.S. **Métodos Baseados Em Pcr Para Análise De Polimorfismos De Ácidos Nucléicos**. Ribeirão Preto: : Holos Editora, 2001.
- MAYR, E.; REICHARDT, H. **Populações, Espécies E Evolução**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1977.
- MCMANUS, C.; LOUVANDINI, H.; PAIVA, S.R. *et al.*, Genetic Factors of Sheep Affecting Gastrointestinal Parasite Infections in the Distrito Federal, Brazil. **Veterinary Parasitology** 166, (2009): 308–313.

- MCMANUS, C.; COBUCCI, J.; BRACCINI NETO, J. *et al.*, Decision Making in Animal Breeding Programs and their Consequences for Animal Production. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.35, n.2, p.69-76, 2011.
- MCMICHAEL, A.J.; POWLES, J.W.; BUTLER, C.D. *et al.*, Food, Livestock Production, Energy, Climate Change, and Health. **The Lancet** 370.9594 (2007): 1253-63.
- MEADOWS, J.R.S.; CEMAL, I.; KARACA, O. *et al.*, Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified from Sheep Breeds of the near East. **Genetics** 175.3 (2007): 1371.
- MEADOWS, J.R.S.; HAWKEN, R.J.; KIJAS, J.W. Nucleotide Diversity on the Ovine Y Chromosome. **Animal Genetics** 35.5 (2004): 379-85.
- MEADOWS, J.R.S.; KIJAS, J.W. Re-Sequencing Regions of the Ovine Y Chromosome in Domestic and Wild Sheep Reveals Novel Paternal Haplotypes. **Animal Genetics** 40.1 (2009): 119-23.
- MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, M.N. *et al.*, Caracterização Genética De Raças Caprinas Nativas Brasileiras Utilizando-Se 27 Marcadores Microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia** 35.4 (2006): 1336-41.
- MONTE, A.L.S.; SELAIVE-VILLARROEL, A.B.; GARRUTI, D.S. *et al.*, Parâmetros Físicos e Sensoriais de Qualidade da Carne de Cabritos Mestiços de Diferentes Grupos Genéticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27.2 (2007): 233-8.
- MORAIS, O.R. O Melhoramento Genético Dos Ovinos No Brasil. In: **Melhoramento Genético Aplicado À Produção Animal**. Ed. J.C.C Pereira. Belo Horizonte: FEPMUZ, 2001. 555.
- MORITZ, C.; BROWN, W.M. Tandem Duplications in Animal Mitochondrial Dnas: Variation in Incidence and Gene Content among Lizards. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 84.20 (1987): 7183.
- NASCIMENTO, R.B.; RIBEIRO, M.N.; Oliveira, J.C.V.; SILVA, N.M.V.; MENDONÇA JR, A.F.; ALVES. A.G.C. **Morphostructural and Breeding System Characterization of Moxotó Goats at the Center of Origin Based on Local Knowledge**. In: 10th International Conference On Goats, IGA. Recife, 2010.
- NELSON, D.L.; COX, M.M.; CUCHILLO, C.M. **Lehninger Princípios De Bioquímica**. Omega, 2001.
- NEWMAYER, D.D.; FERGUSON-MILLER, S. Mitochondria: Releasing Power for Life and Unleashing the Machineries of Death. **Cell** 112.4 (2003): 481-90.
- OLIVEIRA, J.D.; IGARASHI, M.L.S.P.; MACHADO, T.M.M. *et al.*, Structure and Genetic Relationships between Brazilian Naturalized and Exotic Purebred Goat Domestic Goat (*Capra Hircus*) Breeds Based on Microsatellites. **Genetics and Molecular Biology** 30 (2007): 356.
- PAIVA, S.R. **Caracterização Da Diversidade Genética De Ovinos No Brasil Com Quatro Técnicas Moleculares**. f. 108. Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- PAIVA, S.R.; PIMENTEL, C.M. **Origem E Diversidade Genética Da Ovelha Crioula Do Pantanal**. Relatório Parcial De Pesquisa Relativo Às Atividades De Pesquisa Entre a Uniderp, Unb E Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia. Brasília: Embrapa, 2007.
- PAIVA, S.R.; SANTOS, S.A.; VILARINHO, K.R. **Origem E Diversidade Genética Do Ovíno Crioulo Da Região Do Pantanal-Ms**. Relatório Parcial De Pesquisa Relativo Às Atividades De Pesquisa Entre Embrapa Pantanal E Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia. Brasília: Embrapa, 2008.

- PAIVA, S.R.; FACÓ, O.; FARIA, D.A. *et al.*, Molecular and Pedigree Analysis Applied to Conservation of Animal Genetic Resources: The Case of Brazilian Somali Hair Sheep. **Tropical Animal Health Production** (2011) 43:1449–1457.
- PEDROSA, S.; UZUN, M.; ARRANZ, J.J. *et al.*, Evidence of Three Maternal Lineages in near Eastern Sheep Supporting Multiple Domestication Events. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 272.1577 (2005): 2211.
- PEREIRA, F.; DAVIS, S.J.M.; PEREIRA, L. *et al.*, Genetic Signatures of a Mediterranean Influence in Iberian Peninsula Sheep Husbandry. **Molecular Biology and Evolution** 23.7 (2006): 1420-26.
- PETIT, E.; BALLOUX, F.; EXCOFFIER, L. Mammalian Population Genetics: Why Not Y? **Trends in Ecology & Evolution** 17.1 (2002): 28-33.
- PORTER, V. **Goats of the World**. Farming Press, 1996.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia Da Conservação**. São Paulo: Vozes, 2001.
- QUADROS, D.G. **Caprinas Para Produção De Carne**. Barreiras: Universidade do Estado da Bahia. , 2005.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética Na Agropecuária**. Lavras: UFLA, 2000.
- RAMEY II, R.R.; LUIKART, G.; SINGER, F.J. Genetic Bottlenecks Resulting from Restoration Efforts: The Case of Bighorn Sheep in Badlands National Park. **Restoration Ecology** 8.4S (2000): 85-90.
- RYDER, M.L. **Sheep**. Evolution of Domesticated Animals. Ed. I. L. MASON. London/New York: Longman Group, 1984.
- SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G. *et al.*, Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature** 265 (1977): 687–95.
- SANTIAGO, A.A. **Os Cruzamentos Na Pecuária Bovina**. São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1975.
- SANTOS, S.A. **Caracterização Do Sistema De Criação e Das Raças De Ovinos Naturalizadas Da Planície Pantaneira**. Embrapa Pantanal, 2005a.
- SANTOS, S.A. **Descrição Do Manejo Geral De Cavalos Pantaneiros Na Região Do Pantanal**. Embrapa Pantanal, 2005b.
- SARDINA, M.T.; BALLESTER, M.; MARMI, J. *et al.*, Phylogenetic Analysis of Sicilian Goats Reveals a New Mtdna Lineage. **Animal Genetics** 37.4 (2006): 376-78.
- SCHLÖTTERER, C. The Evolution of Molecular Markers-Just a Matter of Fashion? **Nature Reviews Genetics** 5.1 (2004): 63-69.
- SILVA, F.L.R.da; ARAUJO, A.M.de. **A Raça Moxotó no Nordeste do Brasil**. Sobral: Embrapa Caprinos. Embrapa Caprinos, 1999.
- SOUSA, W.H. "Programa De Melhoramento Dos Caprinos De Corte No Nordeste Do Brasil E Suas Perspectivas." Simpósio Nacional de Melhoramento Animal. Campo Grande, 2002. Vol. 4.
- TABERLET, P. The Use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. **Molecular genetic approaches in conservation (TB Smith and RK Wayne, eds.)**. Oxford University Press, New York (1996): 125-42.
- TAYLOR, R.W.; TURNBULL, D.M. Mitochondrial DNA Mutations in Human Disease. **Nature Reviews Genetics** 6 (2005): 389-402.
- TSERENBATAA, T.; RAMEY, R.R.; RYDER, O.A. *et al.*, A Population Genetic Comparison of Argali Sheep (*Ovis Ammon*) in Mongolia Using the Nd5 Gene of

- Mitochondrial DNA; Implications for Conservation. **Molecular ecology** 13.5 (2004): 1333-39.
- VAZ, C.M.S.L. **Morfologia E Aptidão Da Ovelha Crioula Lanada**. Documentos, 22. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2000.
- VAZ, C.M.S.L.; SELAIVE-VILLAROEL, A.B.; CASTRO, S.T.R.; MARIANTE, A.S. **Distribuição Geográfica da Ovelha Crioula Lanada no Brasil**. In: Congreso Latino Americano de Especialistas en Pequeños Ruminantes y Camélidos Sudamericanos; Encontro de Medicina de Pequenos Ruminantes do Cone Sul, 2.; Jornadas Urugaias de Ovinos, 11., 1999, Montevidéo. Proceedings... Montevidéo: Aveper, 1999.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. *et al.*, DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers. **Nucleic acids research** 18.22 (1990): 6531-35.
- WOOD, N.J.; PHUA, S.H. Variation in the Control Region Sequence of the Sheep Mitochondrial Genome. **Animal Genetics** 27.1 (1996): 25-33.
- ZARDOYA, R.; GARRIDO PERTIERRA, A.; BAUTISTA, J.M. *et al.*, Nucleotide Sequence of the Sheep Mitochondrial DNA D-Loop and Its Flanking Trna Genes. **Current genetics** 28.1 (1995): 94-96.

**CAPÍTULO 2 – ORIGEM E DIVERSIDADE DA OVELHA CRIOLA  
NA REGIÃO DO PANTANAL/MS, BRASIL**

## RESUMO

**ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DA OVELHA CRIOLA NA REGIÃO DO PANTANAL/MS, BRASIL.** Cecília de Moraes Carreiro. Samuel Rezende Paiva (orientador).

A ovinocultura brasileira ainda apresenta resultados pouco expressivos e, para que haja a melhora deste setor, estudos têm sido realizados para entender e manejar os rebanhos principalmente de animais naturalizados. Neste sentido, o Laboratório de Genética Animal da Embrapa Cenargen investigou o grupo genético ovino Pantaneiro localmente adaptado ao inóspito ambiente do Pantanal Brasileiro. A origem e a diversidade genética foram analisadas a partir de um marcador genético mitocondrial e dois marcadores nucleares. A linhagem materna foi analisada por sequenciamento de parte do gene mitocondrial ND5, que apresentou quatro SNPs em um fragmento de 541pb. Esses SNPs possibilitaram o agrupamento dos animais analisados em seis haplótipos e demonstraram uma moderada diversidade haplotípica. A diversidade haplotípica dos núcleos de conservação apresentaram os menores valores, pois estes ainda estão em formação. Em relação aos marcadores nucleares, os quatro haplótipos encontrados neste estudo estão de acordo com a literatura. A maioria dos animais apresentou a base nitrogenada A na análise da região promotora-5' do gene SRY no cromossomo Y. Em relação ao microssatélite M18 também presente na região não homóloga do cromossomo Y, quatro alelos foram identificados, sendo o alelo 145 o de maior frequência. O alelo 139 apresentou a menor frequência assim como na literatura. Os ovinos investigados apresentaram grande influência de animais de origem europeia. Em baixa frequência, também foi identificada a origem do Oriente Médio. Apesar da baixa amostragem, os rebanhos dos núcleos de conservação apresentaram diversidade haplotípica satisfatória para a conservação de seus

ovinos. Em virtude do baixo número de marcadores moleculares usados neste estudo, os resultados mostraram uma realidade contraditória. A influência da raça Bergamácia não ficou clara, necessitando de mais estudos. Assim, verifica-se a importância de continuar as análises do grupo genético ovino Pantaneiro.

**Palavras-chave:** animais domésticos naturalizados, América Latina, ND5, SRY, M18.



### ABSTRACT

**ORIGIN AND GENETIC DIVERSITY OF THE CREOLE SHEEP ON THE PANTANAL REGION, BRAZIL.** Cecília de Moraes Carreiro. Samuel Rezende Paiva (advisor).

The Brazilian sheep industry still has some inexpressive results and to have some improvement in this sector, studies have been conducted to understand and manage the herds mainly of naturalized animals. In this sense, the Animal Genetics Laboratory of *Embrapa Cenargen* has investigated the *Pantaneiro* genetic group sheep locally adapted to the changing environment of the Brazilian Wetland (*Pantanal*). The origin and genetic diversity were analyzed by a mitochondrial genetic marker and two nuclear markers. The maternal lineage was analyzed by sequencing the mitochondrial ND5 gene that showed four SNPs in a fragment of 541bp. These SNPs allowed the grouping of animals analyzed in six haplotypes and showed a moderate haplotype diversity. The haplotype diversity of the conservation centers showed the lowest values because they are still being formed. For nuclear markers, the four haplotypes found in this study are consistent with the literature. Most of the animals presented nucleotide A in the analysis of the SRY gene promoter-5' region on chromosome Y. Regarding the M18 microsatellite also present in the non-homologous Y chromosome region, four alleles were identified and the allele 145 showed the highest frequency. The allele 139 showed the lowest frequency in the literature as well. The investigated ovine showed high influence of European sheep. In low frequency, the Middle Eastern influence was also identified. Despite the low sampling herds of the conservation centers exhibit satisfactory

haplotype diversity to be used in their sheep conservation. Due to the low number of markers used in this study, the results showed a contradictory reality. Bergamacea influence was not clear, needing more studies. Thus, there is the importance to continue the analysis of the *Pantaneiro* genetic sheep group.

**Keywords:** naturalized domestic animals, Latin America, ND5, SRY, M18.

## 1. INTRODUÇÃO

Os ovinos crioulos da América são caracterizados pela notória adaptação a ambientes inóspitos (Mariante *et al.*, 1999). Em cada região do continente, os animais domésticos trazidos pelos colonizadores evoluíram diferentemente, não só sobrevivendo como também mantendo uma produtividade adequada às necessidades locais (carne, lã e/ou leite). Esses animais passaram a representar raças localmente adaptadas. No Sul do Brasil, a raça Crioula desenvolveu-se em um ambiente de temperaturas extremas ao longo do ano fornecendo alimento e lã aos habitantes da região (Mariante & Cavalcante, 2006). Acredita-se que esses habitantes com as migrações levaram consigo seus animais de produção e passaram a ocupar o Pantanal Brasileiro junto com os ovinos Crioulos. Atualmente, nesta região, existem ovinos fenotipicamente assemelhados aos ovinos Crioulos, mas que já apresentam características próprias, o grupo genético ovino Pantaneiro (Frazilio, 2005; Santos, 2005).

Vários estudos demonstram que os ovinos Pantaneiros caracterizam-se, diferentemente das raças comerciais, por alta resistência parasitária e boa adaptação aos ambientes alagados próprios do Pantanal (Frazilio, 2005; Santos, 2005) e tolerância ao calor. A compreensão e a conservação desse grupo genético podem ajudar na introgressão dessas características em rebanhos comerciais e aumentar a produtividade da ovinocultura comercial. Outra vantagem seria a possibilidade de fornecer dividendos à população local que mantém e aproveita esse recurso genético típico de regiões alagadas como o Pantanal Brasileiro.

Para melhor entender o grupo genético ovino Pantaneiro, este estudo teve o objetivo de analisar a origem e a diversidade genética de rebanhos do grupo ovino crioulo da região do Pantanal Brasileiro. Desta forma, a origem e a diversidade foram analisadas através de marcadores nucleares (Meadows *et al.*, 2004; Meadows *et al.*, 2007) e mitocondriais (Tserenbataa *et al.*, 2004; Paiva, 2005; Meadows *et al.*, 2006) tanto para abordar as linhagens paternas como maternas, respectivamente, entendendo a formação do rebanho ovino Pantaneiro (Petit *et al.*, 2002).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

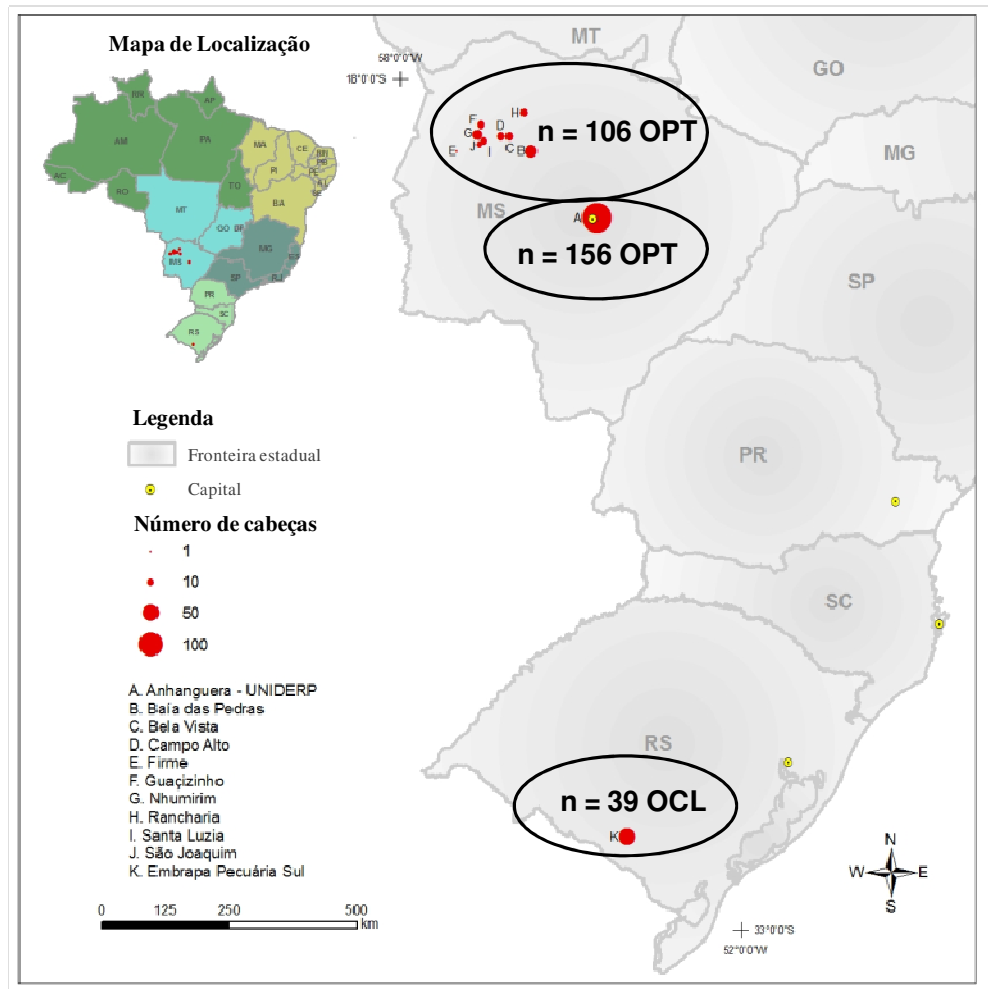
### 2.1 Amostragem

O material biológico usado neste trabalho corresponde a amostras de sangue e/ou pelo de ovinos Pantaneiros de dez diferentes regiões (Tabela 2.1; Figura 2.1). O sangue coletado foi armazenado em tubos Vacutainer<sup>®</sup> contendo EDTA, posteriormente, avaliado e transferido para tubos Eppendorf<sup>®</sup>. As amostras foram mantidas sob refrigeração a -20°C até o processamento para extração de DNA. Os pelos foram coletados com o bulbo capilar e essas amostras foram armazenadas em envelopes de papel à temperatura ambiente.

**Tabela 2.1** Locais de coleta em diferentes fazendas, região, tempo em que os rebanhos estão fechados, tipo de material biológico coletado, número de indivíduos amostrados (n) e sexo das amostras do grupo genético ovino crioulo na região do Pantanal.

Localidade	Região	Tempo (anos)	Tecido	n	Sexo	
					♀	♂
<b>Anhanguera-UNIDERP</b>	Campo Grande/MS	0	Sangue	159	145	14
<b>Baía das Pedras</b>	Pantanal/MS	0	Pelo	29	29	-
<b>Bela Vista</b>	Pantanal/MS	15	Sangue	11	9	2
<b>Campo Alto</b>	Pantanal/MS	20	Sangue	11	10	1
<b>Firme</b>	Pantanal/MS	0	Sangue	1	-	1
<b>Guaçuzinho</b>	Pantanal/MS	20	Sangue	11	10	1
<b>Nhumirim (Embrapa Pantanal)</b>	Pantanal/MS	0	Sangue	17	9	8
<b>Rancharia</b>	Pantanal/MS	5	Pelo	10	8	2
<b>Santa Luzia</b>	Pantanal/MS	15	Sangue	9	6	3
<b>São Joaquim</b>	Pantanal/MS	50	Sangue	7	5	2
<b>TOTAL</b>				265	231	34

Além das amostras de OPT, foram usadas 39 amostras (29 fêmeas e 10 machos) de ovinos Crioulos da Embrapa Pecuária Sul (OCL), bem como duas amostras de cada uma das raças ovinas Bergamácia, Île-de-France e Morada Nova, como controles.



**Figura 2.1** Localização das fazendas amostradas. A área de onde foi coletada boa parte das amostras ( $n = 106$  OPT) corresponde a uma única região no Pantanal mato-grossense-do-sul (Nhecolândia) enquanto que as amostras de A são uma coletânea das diferentes regiões pantaneiras. n: número de amostras; OCL: ovino Crioulo; OPT: ovino Pantaneiro.

## 2.2 Extração e Quantificação de DNA

A extração do DNA a partir de amostras de sangue foi realizada por meio dos glóbulos brancos separados por centrifugação. O método de extração escolhido seguiu

protocolo inorgânico modificado (Miller *et al.*, 1988). As amostras de pelo foram acondicionadas a seco em tubos Falcon<sup>®</sup> de 50ml ou em envelopes de papel à temperatura ambiente. Em torno de 25 a 30 bulbos capilares por amostra foram selecionados e cortados em sua base para a extração do DNA de pelos. A técnica de extração do DNA seguiu um protocolo adaptado (Boyce *et al.*, 1989), utilizando-se o detergente catiônico brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB).

Após a extração, todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND1000<sup>®</sup>) com a finalidade de verificar a qualidade e a quantidade de DNA. O DNA concentrado foi dividido em duas alíquotas, uma delas sendo armazenada à -80°C e a outra à -20°C. Essa segunda alíquota foi diluída a 3ηg/μl para padronizar o DNA a ser usado nas reações em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Para verificar a padronização das amostras, o DNA diluído foi quantificado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio à tensão de 200V e 300mA em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA). Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com o equipamento EagleEye II Stratagene<sup>®</sup>. Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética Animal (LGA), na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. As amostras extraídas, bem como os tecidos coletados, foram depositados no Banco de DNA e Tecidos do LGA.

### 2.3 Amplificação de Fragmentos de DNA

Para a análise de origem e caracterização dos ovinos Pantaneiros, três regiões de DNA foram amplificadas. A primeira região estudada foi parte do gene ND5 no DNA mitocondrial para todos os indivíduos. Para tal, a seguinte reação de PCR foi realizada: 0,5μM de cada *primer*, 1,0mM dNTP, 5,0mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de Taq DNA polimerase, 5,4ηg de DNA e tampão 1X (Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl) em um volume final de 10μL. Os parâmetros de amplificação no termociclador seguiram o seguinte protocolo: ciclo inicial de desnaturação à 95°C por 5 minutos, 36 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* à 56°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final dos produtos à 72°C por 4 minutos.

No DNA nuclear, foram amplificados dois *loci* do cromossomo Y em amostras de machos: M18 e SRY. As reações de PCR seguiram as seguintes condições: 0,15µM de cada *primer* M18 ou 0,1µM de cada *primer* SRY, 4,5ng de DNA e os reagentes do kit comercial da Qiagen® (50% de mix para PCR, 10% do tampão *Qsolution* e água livre de RNase) em um volume final de 10µL. Os parâmetros de amplificação no termociclador seguiram o seguinte protocolo: ciclo inicial de desnaturação à 95°C por 15 minutos, ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* por 1 minuto e 30 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto, e uma extensão final dos produtos à 72°C por 30 minutos. O número de ciclos de desnaturação e a temperatura de anelamento dos *primers* M18 e SRY foram, respectivamente, 35 e 40 vezes, bem como 52°C e 58°C.

Para verificação das reações, os produtos de PCR foram separados em géis de agarose a 1% corados com brometo de etídio por uma hora. Foi aplicada tensão de 160V e 300mA em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA). Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com o equipamento EagleEye II – Stratagene®.

Devido à importância da análise de vários marcadores para inferências populacionais, outros *loci* foram testados. As nomenclaturas e sequências de cada *primer* estão descritas na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** *Primers* usados nas reações de PCR.

Região	Nomenclatura	Sequência (5'-3')	Direção	Tamanho do fragmento (pb)
mtDNA	CytB F <sup>1</sup>	GTCATCATCATTCTCACATGGAATC	direto	1272
	CytB R <sup>1</sup>	CTCCTTCTCTGGTTTACAAGACCAG	reverso	
	CytB F <sup>2</sup>	CCCCACAAAACCTATCACAAA	direto	741
	CytB R <sup>2</sup>	AGGGAGGTTGGTTGTTCTCC	reverso	
	CytB_IN_F <sup>2</sup>	ACCTCCTTTCAGCAATTCCA	direto	765
	CytB_IN_R <sup>2</sup>	CCTGTTTCGTGGAGGAAGAG	reverso	
	HC2 <sup>3</sup>	CACGCGGCATGGTGAACAAGCTCG	direto	1246
	tRNA-Phe <sup>3</sup>	TCATCTAGGCATTTTCAGTG	reverso	
	tRNA-Pro <sup>3</sup>	CTCACCATCAACCCCAAAGC	reverso	657
	ND5L <sup>4</sup>	AATAGTTTATCCAGTTGGTCTTAGG	direto	
ChrY	ND5RI <sup>4</sup>	AAGATTTGTTGGAGATCTCAGGTG	reverso	619
	SRY <sup>5</sup>	TCAGTAGCTTAGGTACATTCA	direto	
	SRY <sup>5</sup>	GTGCTACATAAATATGATCTGC	reverso	139-145
	SRYM18F <sup>6</sup>	GGCATCACAAACAGGATCAGCAAT	direto	
	SRYM18R <sup>6</sup>	GTGATGGCAGTTCTCACAATCTCCT	reverso	

<sup>1</sup> Meadows e colaboradores, 2005; <sup>2</sup> Pedrosa e colaboradores, 2005; <sup>3</sup> Paiva, 2005; <sup>4</sup> Tserenbataa e colaboradores, 2004; <sup>5</sup> Meadows e colaboradores, 2004; <sup>6</sup> Meadows e colaboradores, 2006

## 2.4 Purificação da PCR e Reação de Sequenciamento

Após as reações de PCR, as amostras foram purificadas pelo protocolo Exo-SAP (versão 3 Applied Biosystems). Para cada 5µl de produto de PCR, um mix contendo 0,5U da enzima Exonuclease I (Exo) e 0,5U da enzima Fosfatase Alcalina de Camarão (*Shrimp Alkaline Phosphatase* – SAP) foi preparado e distribuído no volume final de 1µl. No termociclador, o programa usado foi de ciclo único para anelamento das enzimas por 30 minutos à 37°C e inativação enzimática por 20 minutos à 80°C.

Com o produto da PCR purificado, realizou-se a reação de sequenciamento segundo método de Sanger-Coulson. Para cada amostra, usou-se 0,5µl de Big Dye (versão 3, Applied Biosystems), 1,75µl de tampão (5X, Applied Biosystems), 2,0µl de cada *primer* a 1,6µM (direto ou reverso), 4,25µl de água ultra pura e 1,5µl de DNA purificado com Exo-SAP a cerca de 10ng. No termociclador, os passos do programa foram: ciclo inicial de desnaturação à 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de desnaturação à 96°C por 10 segundos, anelamento dos *primers* à 50°C por 5 segundos e extensão à 60°C por 4 minutos.

Por fim, realizou-se a purificação da reação de sequenciamento. Para cada amostra, foram adicionados 3,0µl de EDTA a 125mM e 25µl de etanol 100% gelado. Depois de mixadas, as amostras permaneceram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foram centrifugadas à 4°C por 30 minutos a 3000g. Logo após, houve a remoção do excedente de EDTA e etanol 100%, e, a cada amostra, adicionou-se 30µl de etanol 70% em temperatura ambiente. A remoção do excedente do etanol 70% foi feita em temperatura ambiente por cerca de 1 hora. Foram adicionados 10µl de formamida (Hi-Di) em cada amostra e as mesmas foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C e receberam choque térmico em gelo. Imediatamente após esta etapa, as amostras foram levadas ao seqüenciador (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer<sup>®</sup> ou ABI 3730 DNA Analyzer<sup>®</sup> – Applied Biosystems).



## **2.5 Genotipagem do microssatélite M18 no cromossomo Y**

Após amplificação do microssatélite M18 específico a região não recombinante do cromossomo Y de ovinos via PCR, as amostras foram diluídas na proporção de 1 parte de produto de PCR para 2 partes de água ultra pura. Tal produto diluído foi mantido à -20°C até o preparo para a eletroforese capilar e posterior genotipagem.

Para eletroforese capilar, um mix contendo 4µl de Hi-Di e 2µl do marcador padrão de tamanho molecular corado com a fluorescência carboxi-X-rodamina (ROX). O volume de 6µl deste preparado foi adicionado a 4µl do produto de PCR anteriormente diluído. Antes de submeter as amostras à eletroforese capilar, realizou-se uma etapa de desnaturação à 95°C por 5 minutos para diminuir a taxa de anelamento do DNA, sendo colocadas imediatamente em gelo até a genotipagem, realizada no seqüenciador ABI 3730® (Applied Biosystems).

## **2.6 Análise dos Dados**

### **2.6.1 DNA mitocondrial**

Os dados do sequenciamento de ND5 foram analisados e editados no programa SeqScape® versão 2.7 (Applied Biosystems). Dados gerados por diferentes seqüenciadores tiveram seus parâmetros de análise corrigidos para cada modelo e rotina de trabalho. Posteriormente, utilizou-se o programa MEGA versão 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) para

alinhamento e edição de todas as amostras com a sequência referência [AF010406] (Hiendleder *et al.*, 1998) e demais sequências do *GenBank* (Tabela 2.3).

No programa DNAsp versão 5 (Librado & Rozas, 2009), as sequências analisadas foram agrupadas de acordo com as localidades e as análises intra e inter-populacionais foram realizadas. Para cada população, foram feitas as seguintes análises: contagem de sítios polimórficos, de número de haplótipos e de haplótipos diagnósticos; e cálculo de diversidade haplotípica e de diversidade nucleotídica. Em outra análise, todas as populações de OPT foram agrupadas para formar uma única população e comparadas à população de OCL. Finalmente, todas as populações analisadas foram estudadas em associação com as sequências do *GenBank* e os mesmos parâmetros foram analisados. Na Tabela 2.4, estão descritos detalhadamente todos os agrupamentos realizados para as análises estatísticas.

Para análise de diferenciação genética entre as populações, os agrupamentos descritos na Tabela 2.4 foram testados com 1.000 permutações no programa Arlequin versão 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificar a proporção da variação genética dentro e entre as populações, assim como as estatísticas F de Wright. Os tipos de mutações e a relação entre o número de haplótipos gerados foram analisados através da construção de uma rede haplotípica pelo programa Network versão 4.1.1.2 (*Fluxus Technoloty Ltd* – [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) por meio do método *Median-Joining* – MJ (Bandelt *et al.*, 1999).

**Tabela 2.3** Número de acesso das sequências de *Ovis aries* obtidas no *GenBank* para análises comparativas ao grupo ovino Pantaneiro. Os haplótipos (H) descritos correspondem às análises realizadas neste trabalho.

<b>Acesso</b>	<b>Raça</b>	<b>H</b>	<b>Referência</b>
AF010406	Merino Landschaf	<b>H1</b>	Hiendleder <i>et al.</i> , 1998
DQ320084	Finn Dorset	<b>H1</b>	Burgstaller <i>et al.</i> , 2005
DQ320085	Finn Dorset	H7	
EF490451	Finn Dorset	<b>H1</b>	Burgstaller <i>et al.</i> , 2007
EF490452	Finn Dorset	<b>H1</b>	
EF490453	Finn Dorset	<b>H1</b>	
EF490454	Finn Dorset	H7	
EF490455	Finn Dorset	<b>H1</b>	
EF490456	Finn Dorset	<b>H1</b>	
EU854593	Crioula (Serrana)	H12	Gonçalves <i>et al.</i> , 2010
EU854594	Crioula (Serrana)	H13	
EU854595	Crioula (Serrana)	H14	
EU854596	Crioula (Serrana)	H15	
EU854597	Crioula (Serrana)	H16	
EU854598	Crioula (Serrana)	H17	
EU854599	Crioula (Serrana)	H18	
EU854600	Crioula (Serrana)	H19	
EU854601	Crioula (Serrana)	H20	
EU854602	Crioula (Serrana)	H21	
EU854603	Crioula (Serrana)	H22	
EU854604	Crioula (Serrana)	H23	
EU854605	Crioula (Serrana)	H24	
EU854606	Crioula (Serrana)	H25	
EU854607	Crioula (Fronteira)	<b>H2</b>	
EU854608	Crioula (Fronteira)	H26	
EU854609	Crioula (Fronteira)	H27	
EU854610	Crioula (Fronteira)	H28	
HM236174	Merino	H8	Meadows <i>et al.</i> , 2011
HM236175	Romney	H8	
HM236176	Karakas	<b>H1</b>	
HM236177	Karakas	<b>H1</b>	
HM236178	Karakas	H9	
HM236179	Morkaraman	H9	
HM236180	Morkaraman	<b>H4</b>	
HM236181	Morkaraman	<b>H4</b>	
HM236182	Awassi	H10	
HM236183	Tuj	H11	
S49213	Merino Landschaf	<b>H1</b>	Hiendleder <i>et al.</i> , 1992

Em negrito, estão os haplótipos identificados nas amostras analisadas. Entre parênteses, estão diferenciados os ecótipos da raça.

**Tabela 2.4** Agrupamentos realizados para análises de divergência genética e análise de variância molecular.

<b>Grupo</b>	<b>Agrupamento</b>	<b>Populações</b>	<b>n</b>
<b>I</b>	Populações analisadas individualmente	BdP x BV x CA x F x G x R x SL x SJ x U x EP x OCL	304
<b>II</b>	3 populações OPT <i>versus</i> OCL	OPT (BdP + BV + CA + F + G + R + SL + SJ) x U x EP x OCL	89 + 159 + 17 + 39
<b>III</b>	Todas as populações analisadas individualmente	OPT (BdP + BV + CA + F + G + R + SL + SJ) x U x EP x OCL x GB	343
<b>IV</b>	Populações analisadas <i>versus</i> GenBank	(OPT + U + EP) x OCL x GB	265 + 39 + 39

n: tamanho amostral; BdP: Baía das Pedras; BV: Bela Vista; CA: Campo Alto; F: Firme; G: Guaçuizinho; R: Rancharia; SL: Santa Luzia; SJ: São Joaquim; U: Uniderp; EP: Nhumirim; OCL: Embrapa Sul (ovinos Crioulos); GB: *GenBank*. x: *versus*; +: fazendas consideradas como uma única população.

### 2.6.2 Cromossomo Y

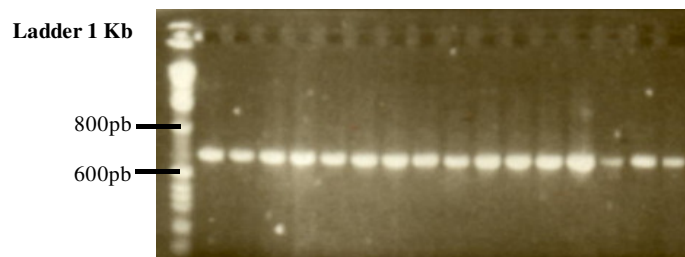
Os dados do sequenciamento de SRY foram analisados e editados no programa SeqScape<sup>®</sup> versão 2.7 (Applied Biosystems) a partir da sequência referência do ChrY [AY604734] de *Ovis aries* (Meadows *et al.*, 2004). As sequências foram separadas de acordo com o genótipo apresentado (A ou G) e as localidades. Já os fragmentos de M18 foram identificados através do programa GeneMapper<sup>®</sup> versão 4.1 (Applied Biosystems), no qual é construída uma curva de regressão em função dos tamanhos padrões com fluorescência ROX. Esse marcador emite cor vermelha e determina a cada pico o tamanho de cada curva. Pelo mesmo programa, também foram identificados os diferentes alelos de cada microssatélite de acordo com a intensidade de cada pico. O tamanho real dos fragmentos foi determinado pela presença das amostras referências descritas no item Amostragem.

Com a associação tanto dos dados do sequenciamento como dos dados da genotipagem, uma tabela haplotípica foi montada. A Tabela 2.9 seguiu a estrutura e a nomenclatura indicadas por Meadows e Kijas (Meadows & Kijas, 2009).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 DNA Mitocondrial

Foi obtido um fragmento de cerca de 600pb da região mitocondrial ND5 (Figura 2.2), sendo que apenas um indivíduo foi descartado. A região obtida corresponde às posições 11740 a 12280 quando comparada à sequência do mtDNA completo de *Ovis aries* [AF010406] (Hiendleder *et al.*, 1998). Após edição das sequências, foi editado um fragmento de 541pb e foram verificados quatro SNPs nas amostras deste trabalho, sendo todos caracterizados como transições (Tabela 2.5). Posteriormente, as sequências do LGA foram conjuntamente analisadas com 39 sequências depositadas no *GenBank* referentes ao mesmo *locus* de *Ovis aries*. A região analisada corresponde às posições 11815 a 12260 (Tabela 2.5).



**Figura 2.2** Gel de agarose 1% para verificação do sucesso da PCR da região do DNA mitocondrial correspondente ao gene ND5.

Foi observado um total de seis haplótipos diferentes (H1-H6; Tabela 2.5). O haplótipo mais frequente (H1) foi idêntico à sequência referência do genoma mitocondrial da espécie. As populações amostradas neste trabalho apresentam cerca de três haplótipos cada, sendo três dos seis haplótipos exclusivos do grupo genético Pantaneiro (H4-6; Tabela 2.6). A população Uniderp foi a que apresentou o maior número de haplótipos (n=6).

Na análise de divergência gênica dentro das diferentes populações do LGA (Tabela 2.6), verifica-se que as diversidades haplotípicas ( $h$ ) variam de 0,1484 a 0,6389. Na fazenda Firme, a amostragem foi de apenas um indivíduo, o que não permite a inferência de diversidade intra-populacional, demonstrada pelo valor de  $h=1,0$ . Em relação às populações OPT, a fazenda Santa Luzia apresenta o maior  $\pi$  ( $0,6389\pm 0,1258$ ), sendo o menor  $\pi$  observado no recente Núcleo de Conservação deste grupo genético na Embrapa Pantanal ( $0,2279\pm 0,1295$ ). De todas as populações analisadas, o menor  $h$  é o do rebanho da Embrapa Pecuária Sul de ovinos Crioulos.

Em relação à diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), a variação encontrada foi de 0,00028 a 0,00158. Das populações de OPT, a maior diversidade nucleotídica é representada pela fazenda São Joaquim ( $0,00158\pm 0,00076$ ) e a menor diversidade foi encontrada na fazenda Nhumirim/Embrapa Pantanal ( $0,00043\pm 0,00026$ ). Mais uma vez, não foi possível determinar  $\pi$  para a fazenda Firme pela questão da amostragem citada acima.

Quando o agrupamento realizado das populações considera Uniderp e Nhumirim/Embrapa Pantanal regiões diferentes das outras fazendas de OPT, totalizando três grupos OPT distintos, foram observados valores de  $h$  de 0,2279 a 0,5863 (Tabela 2.7). A maior diversidade haplotípica é verificada na união das outras fazendas OPT ( $0,5863\pm 0,0252$ ). Já o menor  $h$  encontrado nas populações OPT é da fazenda Nhumirim/Embrapa Pantanal ( $0,2279\pm 0,1295$ ).

A diversidade nucleotídica, quando considerados esses três grupos de OPT, encontra-se entre 0,00055 e 0,00157. O maior valor de  $\pi$  é verificado no grupo das outras fazendas de OPT ( $0,00157\pm 0,00013$ ) sem os rebanhos Uniderp e Nhumirim/Embrapa Pantanal. Novamente, o menor valor de  $\pi$  é visto na fazenda Nhumirim/Embrapa Pantanal ( $0,00055\pm 0,00032$ ).

As diversidades nucleotídicas não são diretamente proporcionais às haplotípicas. Elas são influenciadas por número de indivíduos e frequência dos haplótipos. Os menores valores de  $\pi$  foram identificados nas fazendas com dois haplótipos distintos. Quando cerca de três haplótipos por fazenda foi identificado,  $\pi$  aumentou com a presença do haplótipo 4 que foi observado em baixa frequência. Contudo, na fazenda Baía das Pedras, o haplótipo 4 não aumentou a  $\pi$ , já que apenas um indivíduo apresentou esse haplótipo. A fazenda Uniderp teve baixo  $\pi$ , apesar de ter seis haplótipos, por apresentar a maior amostragem, fazendo com que o efeito desses haplótipos ficasse diluído. Fazendas com três haplótipos distintos, mas

com a presença de um haplótipo em baixa frequência (H4), em geral, tiveram maiores  $\pi$ , porém com valores ainda baixos.

**Tabela 2.5** Tabela de haplótipos baseados no marcador mitocondrial ND5. Os seis haplótipos identificados neste estudo (H1-H6) foram comparados à sequência referência e às sequências depositadas no *GenBank*.

HAPLÓTIPO	Posição mtDNA																				Frequência Haplótipica				Network	
																					Grupos Analisados					Total
	C	A	C	T	C	C	T	C	C	G	C	A	A	A	T	G	A	T	C	C	A	OPT	OCL	GB		
AF010406 <sup>1</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	141	2	10	H1	
H1 <sup>a</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	99	36	1	H2	
H2 <sup>b</sup>	8	8	8	8	8	9	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	1	15	H3	
H3	1	2	3	4	6	1	2	2	6	8	1	2	4	4	5	7	8	8	8	9	9	7	2	9	H4	
H4 <sup>c</sup>	5	1	2	4	6	9	5	1	3	7	6	7	5	8	9	4	1	0	2	5	1	2	2	2	H5	
H5																						2	2	2	H6	
H6																						2	2	2	H7	
DQ320085 <sup>2</sup>																									H12	
EF490454 <sup>2</sup>																									H13	
EU854593 <sup>3</sup>																									H14	
EU854594 <sup>3</sup>	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H15	
EU854595 <sup>3</sup>	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H16	
EU854596 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H17	
EU854597 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H18	
EU854598 <sup>3</sup>	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H19	
EU854599 <sup>3</sup>	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H20	
EU854600 <sup>3</sup>	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H21	
EU854601 <sup>3</sup>	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H22	
EU854602 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H23	
EU854603 <sup>3</sup>	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H24	
EU854604 <sup>3</sup>	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H25	
EU854605 <sup>3</sup>	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H26	
EU854606 <sup>3</sup>	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H27	
EU854608 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H28	
EU854609 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H8	
EU854610 <sup>3</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H8	
HM236174 <sup>4</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H9	
HM236175 <sup>4</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H9	
HM236178 <sup>4</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H10	
HM236179 <sup>4</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H10	
HM236182 <sup>4</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H11	
HM236183 <sup>4</sup>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	H11	

mtDNA: DNA mitocondrial; OPT: ovino Pantaneiro; OCL: ovino Crioulo; GB: *GenBank*. <sup>1</sup> Hiendler *et al.*, 1998; <sup>2</sup> Burgstaller *et al.*, 2007; <sup>3</sup> Gonçalves *et al.*, 2011. <sup>a</sup> AY858379, DQ320084, EF490451-3, EF490455-6, HM236176-7, S49213; <sup>b</sup> EU854607; <sup>c</sup> HM236180-1.



**Tabela 2.6** Tabela de divergência genética gerada através do programa DNAsp de acordo com o agrupamento I.

Parâmetros	BdP	BV	CA	F	G	R	SL	SJ	U	EP	OCL
N° seq	29	11	11	1	11	10	9	7	159	17	39
N° sítios polimórficos	2	2	1	0	2	1	2	3	4	2	2
Diversidade haplotípica	0,5123 ±0,0626	0,5818 ±0,1420	0,5455 ±0,0722	1,0000 ±0,0000	0,5818 ±0,1420	0,5556 ±0,0745	0,6389 ±0,1258	0,5238 ±0,2086	0,5359 ±0,0335	0,2279 ±0,1295	0,1484 ±0,0753
N° haplótipos	3	3	2	1	3	2	3	3	6	3	3
N° haplótipos diagnósticos	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Diversidade nucleotídica	0,00099 ±0,00015	0,00121 ±0,00036	0,00101 ±0,00013	0,00000 ±0,00000	0,00121 ±0,00036	0,00103 ±0,00014	0,00133 ±0,00035	0,00158 ±0,00076	0,00117 ±0,00010	0,00043 ±0,00026	0,00028 ±0,00014

BdP: Baía das Pedras; BV: Bela Vista; CA: Campo Alto; F: Firme; G: Guaçuazinho; R: Rancharia; SL: Santa Luíza; SJ: São Joaquim; U: Uniderp; EP: Nhumirim; OCL: rebanho de ovino Crioulo da Embrapa Pecuária Sul.

**Tabela 2.7** Tabela de divergência genética gerada através do programa DNAsp de acordo com o agrupamento II.

Parâmetros	OPT	U	EP	OCL	GB
N° seq	89	159	17	39	39
N° sítios polimórficos	3	3	2	2	28
Diversidade haplotípica	0,5863 ±0,0252	0,5201 ±0,0335	0,2279 ±0,1295	0,1484 ±0,0753	0,9204 ±0,0373
N° haplótipos	4	5	3	3	25
N° haplótipos diagnósticos	-	2	-	-	22
Diversidade nucleotídica	0,00157 ±0,00013	0,00142 ±0,00012	0,00055 ±0,00032	0,00035 ±0,00018	0,01208 ±0,00132

OPT: outras fazendas de ovino Pantaneiro; U: Uniderp; EP: Nhumirim; OCL: rebanho de ovino Crioulo da Embrapa Pecuária Sul; GB: GenBank.

Os valores da análise de variância molecular (AMOVA) demonstraram que 24,70% ( $p < 0,01$ ) de toda variação genética observada foi em razão de diferenças entre as populações (contraste I; Tabela 2.8). Na segunda sub-estruturação (contraste II), onde Uniderp é diferente da Nhumirim/Embrapa Pantanal e das outras fazendas de OPT, além de OCL, 14,03% da variação genética total foi explicada por esse contraste enquanto que 11,74% da variação foi devida a diferenciações entre populações dentro destes grupos maiores. Quando foram consideradas todas as populações deste estudo versus as amostras disponíveis no *GenBank* (contraste III) foi observado uma diferenciação de 21,98% ( $p < 0,01$ ), um valor muito similar à variação observada apenas entre as amostras deste estudo. Por fim, foi realizada a comparação de variância molecular entre todas as populações de OPT, formando um único grupo, com o grupo OCL e o grupo das sequências do *GebBank* (contraste IV). A porcentagem de variação genética total entre esses três grupos foi igual a 25,63% ( $p < 0,01$ ). Apenas 5,44% de toda variação observada foi em razão de diferenças entre localidades dentro de cada grupo maior.

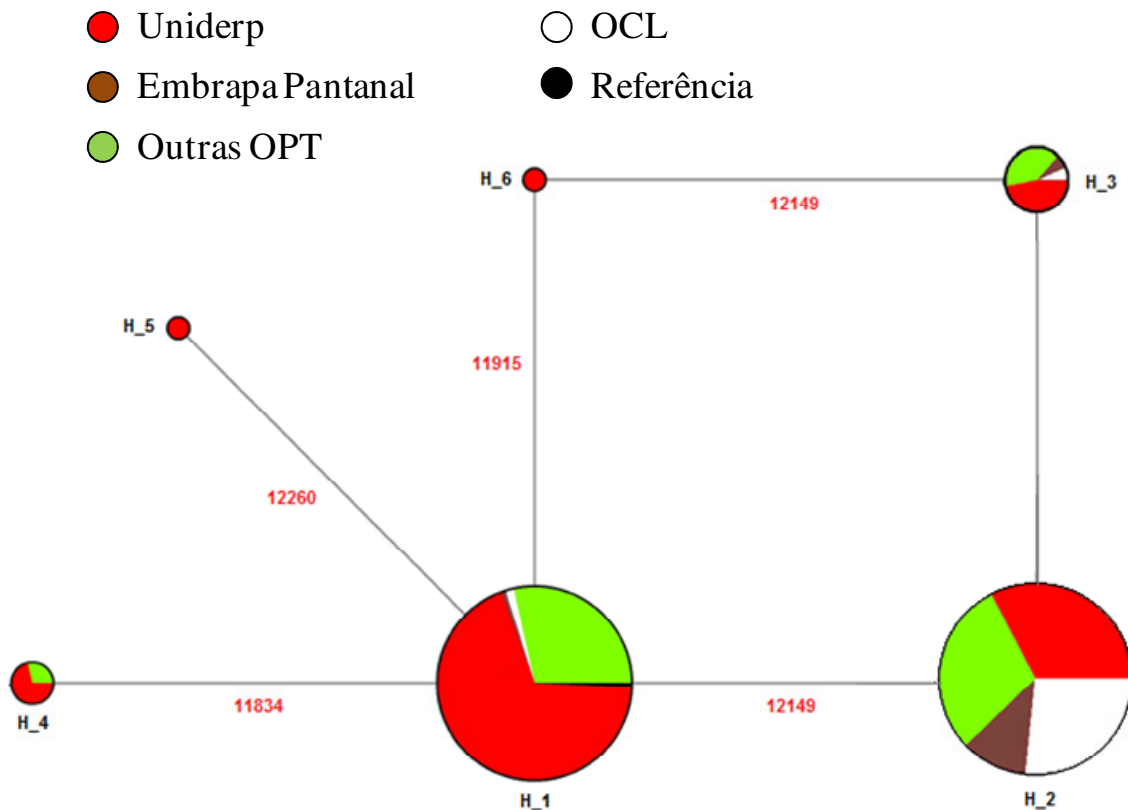
**Tabela 2.8** Análise de variância molecular das populações analisadas a partir do marcador ND5. Para maiores detalhes dos contrastes, ver Tabela 2.4.

Contraste*	Fonte de Variação	g.l.	Soma dos Quadrados	% de Variação
I. Todas as pops independentes	Entre populações	10	21,408	24,70**
	Dentro das populações	293	79,454	75,30**
II. OPT <sup>†</sup> vs OCL	Entre grupos	3	16,383	14,03 <sup>ns</sup>
	Entre populações dentro dos grupos	7	5,025	11,74**
	Dentro das populações	293	79,454	74,23**
III. Pops do estudo vs GB	Entre populações	4	37,876	21,98**
	Dentro das populações	339	181,261	78,02**
IV. OPT + OCL vs GB	Entre grupos	2	30,928	25,63 <sup>ns</sup>
	Entre populações dentro dos grupos	2	6,948	5,44**
	Dentro das populações	339	181,261	68,94**

\* Todas as populações: Tabela 2.1; OPT: ovino Pantaneiro; OCL: ovino Crioulo; Pops: amostras das populações analisadas; GB: *GenBank*; g.l.: grau de liberdade; ns: não significativo; \*\*  $p < 0,01$ ; <sup>†</sup> fazendas de OPT sem o rebanho Uniderp.

Com os resultados da Tabela 2.5, foi estimada uma primeira rede de haplótipos apenas das populações amostradas neste trabalho (Figura 2.3). Ou seja, foram considerados apenas os haplótipos identificados a partir dos SNPs 11834, 11915, 12149 e 12260. O haplótipo 1 foi o mais frequente, agrupando quatro populações (Uniderp, Nhumirim/Embrapa Pantanal, todas as outras fazendas de OPT juntas e o rebanho OCL da Embrapa Sul) e correspondendo à referência do mtDNA depositada no *GenBank*. Tanto o haplótipo 2 como o

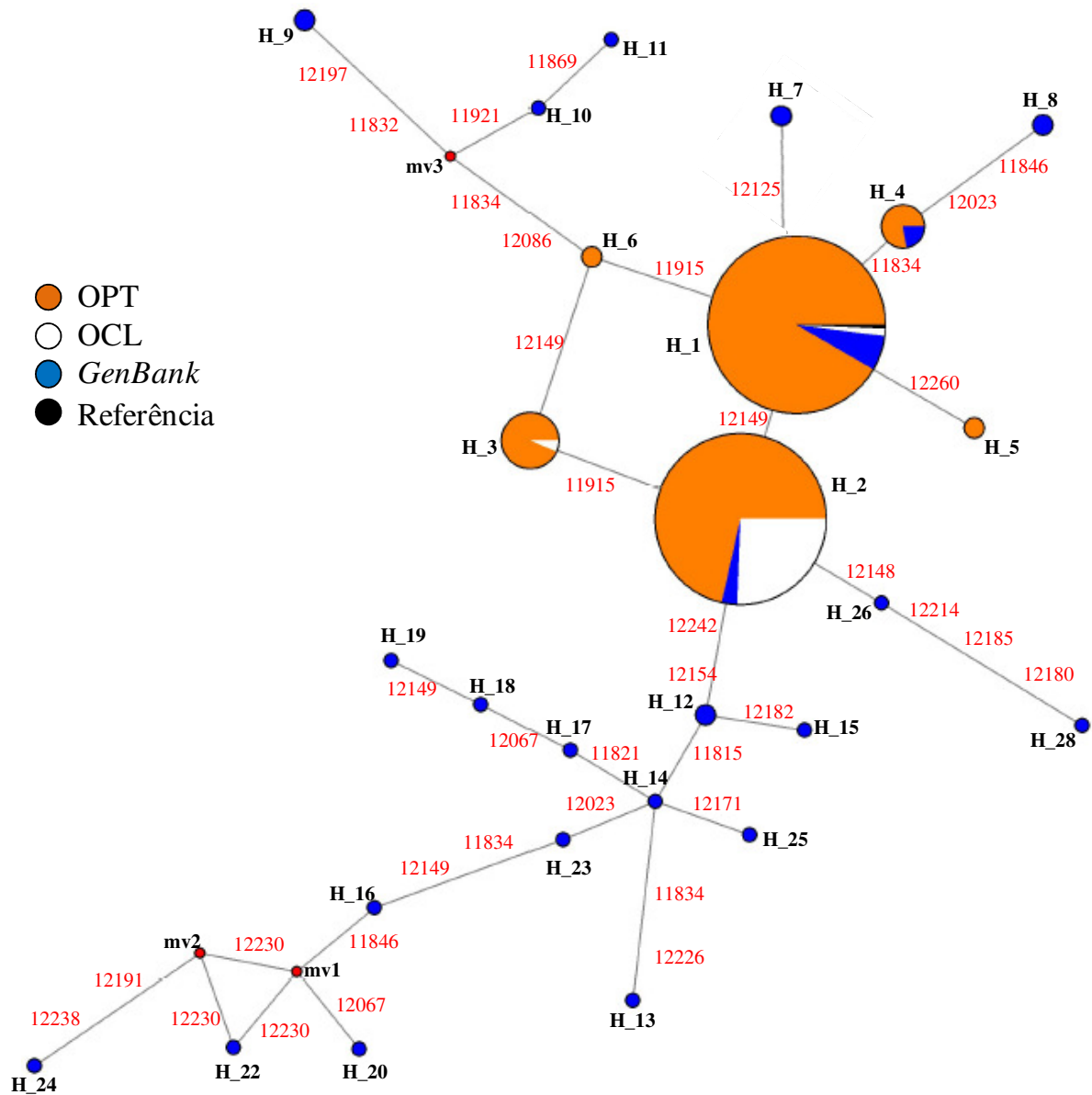
haplótipo 3 são compartilhados também por essas quatro populações. A população OCL apresentou três haplótipos (H1-H3). Os haplótipos H4-H6 são exclusivos de OPT. O haplótipo 4 foi identificado em indivíduos de duas populações (Uniderp e outras fazendas OPT), enquanto que os haplótipos 5 e 6 são formados apenas por indivíduos da fazenda Uniderp.



**Figura 2.3** Rede *Median-Joining* (MJ) gerada a partir de 541pb do gene mitocondrial ND5 por meio do programa Network. Os círculos dos haplótipos possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição das mutações que diferem cada haplótipo da sequência do DNA mitocondrial referência. O grupo “Outras OPT” refere-se a todas as fazendas de OPT, exceto, as fazendas Uniderp e Embrapa Pantanal.

De forma a visualizar qual seria a relação das sequências geradas neste trabalho com as depositadas no *GenBank*, uma nova rede de haplótipos foi gerada também com base na Tabela 2.5 (Figura 2.4). Os haplótipos H1 a H6 correspondem à mesma nomenclatura da Figura 2.3. Os novos haplótipos gerados a partir das sequências do *GenBank* estão representados de H7 a H28, porém algumas dessas sequências compartilham haplótipos das populações analisadas no presente estudo (H1, H2 e H4). Novamente, H1 foi o mais frequente, agrupando indivíduos OPT, OCL e do *GenBank* e também correspondendo à

referência do mtDNA. Os haplótipos das sequências do *GenBank* estão detalhados na tabela 2.3.



**Figura 2.4** Rede haplotípica gerada a partir de 541pb do gene mitocondrial ND5 com a presença das sequências depositadas no *GenBank* e as populações analisadas formando um único grande grupo. Os círculos dos haplótipos possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição das mutações que diferem cada haplótipo da sequência do DNA mitocondrial referência. O grupo OPT refere-se a todas as fazendas de OPT analisadas pelo LGA. mv (*median vector*): vetores médios que representam haplótipos hipotéticos não amostrados nesse estudo.

Além do ND5, os *loci* mitocondriais referentes às partes do gene citocromo oxidase B (CytB) e à região controle (D-Loop) foram testadas ao longo deste trabalho, porém não puderam ser otimizadas e analisadas em virtude do tempo. Vários ensaios de PCR do

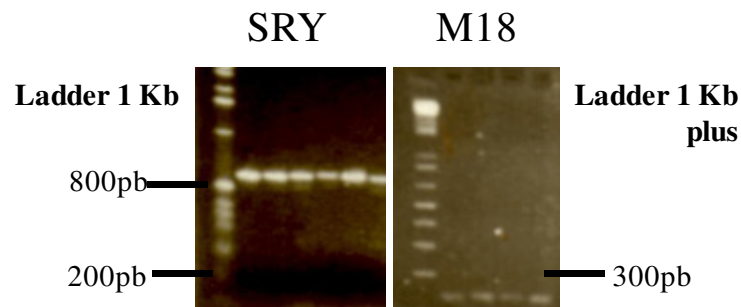
CytB foram realizados de acordo com Meadows e colaboradores (2004), alterando-se concentrações de  $MgCl_2$ , Taq Polimerase e *primers*. Além dessas alterações, inúmeros gradientes de temperatura foram feitos, porém sem sucesso de amplificação. O indício de que houvesse algum problema nos *primers* levou à investigação (Pedrosa *et al.*, 2005) e à aquisição de novos *primers*, que demoraram a serem entregues ao laboratório. Por fim, estes *primers* amplificavam a região, porém com baixa reprodutibilidade, o que acabou não permitindo a análise dessa região do mtDNA.

O outro *locus* investigado foi referente à região controle (D-Loop). Novas alíquotas dos *primers* tiveram que ser encomendadas, levando mais tempo de bancada. Assim que elas chegaram, os testes de PCR foram iniciados segundo Paiva (2005). Alterações de concentrações de vários reagentes e gradientes de temperatura foram testados. Porém a presença de uma banca inespecífica não pode ser eliminada, mesmo com o uso de kits comerciais, impossibilitando a análise desse *locus*.

### 3.2 Cromossomo Y

O fragmento de cerca de 500pb foi amplificado pela PCR na região promotora-5' do gene SRY (Figura 2.5). Após a reação de sequenciamento, o único SNP identificado na literatura foi analisado e editado. Dos 39 machos utilizados, doze apresentaram variação em relação à sequência referência (A>G) e 27 foram similares à referência. Nos rebanhos de OPT, cerca de 70% dos animais amostrados apresentou a base A. O mesmo padrão pôde ser observado no rebanho de OCL.

Em relação ao microssatélite M18 do cromossomo Y, um fragmento de cerca de 150pb foi amplificado (Figura 2.5). Após a genotipagem, quatro alelos diferentes foram identificados. Os alelos 139, 141, 143 e 145 apresentaram, respectivamente, frequências relativas iguais a 0,102, 0,385, 0,205 e 0,308. O alelo 139 foi identificado apenas na população de Uniderp. O alelo mais presente nos diferentes rebanhos foi o alelo 141. Já o alelo 143 só foi verificado no rebanho OCL.



**Figura 2.5** Gel de agarose 1% para verificação do sucesso das PCRs no cromossomo Y.

Com base nesses dois dados do cromossomo Y, a Tabela 2.9 de haplótipos foi montada. Nas populações amostradas, foram identificados quatro dos haplótipos descritos por Meadows & Kijas (2009), cujas nomenclaturas foram mantidas neste trabalho. O haplótipo H8 apresentou a maior frequência (0,385) seguido de H5 (0,308), H6 (0,205) e H12 (0,102). No rebanho OCL, apenas dois haplótipos foram encontrados (H5-6), sendo o H6 diagnóstico dessa população. Em Nhumirim/Embrapa Pantanal, todos os machos apresentam o mesmo haplótipo (H8), sendo este e H12 haplótipos diagnósticos de OPT. Outro evento observado foi o aparecimento do SNP (G) apenas em indivíduos com o alelo 145. A população com maior número de haplótipos diferentes foi a Uniderp (H5, H8 e H12).

**Tabela 2.9** Haplótipos montados a partir da associação de dois marcadores do cromossomo Y.

Haplótipo*	<i>SRYM18</i>	<i>SRY 3F/3R</i>	Frequência Haplótipica								
	Alelo (pb)	SNP	BV	CA	F	SL	SJ	U	EP	OCL	Total
H5	145	G			1	2		5		4	12
H6	143	A								8	8
H8	141	A	1	1		1	2	3	7		15
H12	139	A						4			4

pb: pares de bases; BV: Bela Vista; CA: Campo Alto; F: Firme; SL: Santa Luzia; SJ: São Joaquim; U: Uniderp; EP: Nhumirim; OCL: Embrapa Pecuária Sul (ovinos Crioulos). \* Os haplótipos seguem a nomenclatura estabelecida por Meadows e Kijas (2009).

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou padrões da variabilidade genética de dez fazendas do grupo genético ovino localizado na região do Pantanal brasileiro. A avaliação desses rebanhos em comparação com o Núcleo de Conservação da raça ovina Crioula do Sul do Brasil baseou-se na análise direta de duas classes de marcadores moleculares localizadas em diferentes regiões do genoma (mitocondrial e nuclear). Desta forma, pôde-se investigar melhor a origem e a diversidade deste grupo genético ovino do Pantanal de modo a oferecer subsídios sobre seu possível status de raça, bem como para auxiliar os Núcleos de Conservação.

Quando realizada a análise de divergência genética a partir do gene mitocondrial ND5 (Tabela 2.6) entre todas as populações estudadas, totalizando dez rebanhos de OPT e um de OCL, os dados apontam uma moderada diversidade haplotípica entre os grupos, de acordo com a interpretação qualitativa do  $F_{ST}$  de Wright (Wright, 1978). Porém, deve-se considerar que a amostragem por fazenda foi pequena, o que pode gerar uma interpretação enviesada das diversidades, já que o número de sequências analisadas é considerado nos cálculos de  $h$  e  $\pi$  (Excoffier *et al.*, 1992). Assim, apesar dessa diversidade haplotípica moderada, verificou-se que o número de haplótipos por rebanho foi relativamente baixo e semelhantes entre si, o que se refletiu na baixa diversidade nucleotídica.

Um padrão observado foi a baixa diferenciação genética total dentro das populações e isso diz respeito à hipótese levantada neste estudo em relação à diversidade entre as fazendas de OPT. Com os dados de divergência genética, verificou-se que as diversidades haplotípicas apresentam valores muito próximos (Tabela 2.6), por isso, uma nova análise foi necessária para averiguar essa diversidade. A partir das estimativas da AMOVA (Tabela 2.8), o índice de fixação  $F_{ST}$  revelou que a diversidade entre esses rebanhos OPT apresenta um valor dentro da amplitude de diferenciação genética característica em estudos de raças, nos quais valores de  $F_{ST}$  acima de 0,15 são esperados (Hadjipavlou *et al.*, 2008; Hayes *et al.*, 2009). Isso indica também que as populações OPT têm números semelhantes de haplótipos. Esses resultados indicam uma baixa diferenciação entre todas as

fazendas de OPT. Assim sendo, verifica-se que, a partir deste marcador mitocondrial, os rebanhos de OPT analisados representam uma única população.

Entretanto, a variabilidade observada dentro do grupo OPT na região analisada não pode ser considerada insignificante. A presença de dois haplótipos exclusivos em Uniderp (Tabela 2.6), ainda que em baixa frequência, mostra que existe variabilidade genética em OPT e que esta pode ser usada em programas de conservação e planos de manejo genético de rebanhos. As análises mostram que, dentre as fazendas estudadas, o rebanho com maior diversidade foi Uniderp (Tabela 2.7). Sua análise separada mostrou que esse rebanho representa toda a variabilidade do grupo OPT analisado. Esta afirmação pode ser corroborada na Figura 2.3, na qual se verifica a presença de todos os haplótipos identificados na fazenda Uniderp.

A possível explicação para essa diversidade de Uniderp é a própria formação desse rebanho. Para estudos do ovino típico do Pantanal, o núcleo experimental foi criado pela universidade Anhanguera-UNIDERP a partir de animais de diversas regiões pantaneiras além da região de Nhecolândia, onde as outras fazendas localizam-se (Figura 2.1). Esta poderia também ser uma das explicações para a diversidade tão homogênea entre os outros rebanhos amostrados, indicando que esses ovinos representam uma parcela da variabilidade genética de OPT. Assim, OPTs de outras regiões pantaneiras devem ser analisados para verificar esta hipótese, bem como para aumentar o conhecimento da diversidade genética desses ovinos.

Quando o contraste entre todas as fazendas analisadas foi feito a partir de AMOVA (contraste I; Tabela 2.8), verificou-se que a maior parte da variação genética total, como esperada, foi explicada pela diferenciação dentro das fazendas, sendo também a diferenciação entre as populações significativa (Paiva, 2005). Um aspecto que faz com que resultados de AMOVA sejam altos é o tipo de marcador molecular utilizado neste trabalho. Em geral, análises de variância molecular a partir de marcadores mitocondriais tendem a apresentar índices de fixação maiores que de marcadores nucleares, como em estudos com microssatélites (Paiva, 2005; Meadows & Kijas, 2009; Pérez-Perdal *et al.* 2010). Como explicado anteriormente, isso ocorre por causa dos diferentes modos de herança e taxas de fixação.

Para minimizar as desvantagens descritas dos marcadores mitocondriais, a associação de marcadores em outras regiões genômicas é importante. Na Figura 2.3 com apenas um marcador, verifica-se que OPT e OCL apresentam três haplótipos em comum (H1-



3). Já na Tabela 2.9 com o uso de dois marcadores nucleares, os haplótipos compartilhados pelos dois grupos caem para apenas um (H5). A tendência é que, com o uso de mais marcadores genômicos, cobrindo uma área mais ampla do DNA, se espera aumentar o conhecimento acerca da origem de OPT e OCL.

Ainda sobre a questão dos haplótipos compartilhados entre OPT e OCL (Figura 2.3), isso indica que esses dois grupos genéticos tenham tido uma história evolutiva semelhante apesar de suas particularidades. Sendo ambos de formação mista como a maioria dos ovinos brasileiros, os dados apontam para a possibilidade de OPT ter origem genética ligeiramente diferente e que este grupo está a caminho de uma diferenciação racial do ovino Crioulo, ainda que recente. Os marcadores analisados no DNA nuclear (cromossomo Y) *sensu* Meadows e colaboradores (2010) também serviram de referência para o entendimento da origem da formação de OPT. Em comparação com McManus e colaboradores (2010), a hipótese de origem semelhante pôde ser analisada. Tais autores verificaram a presença de seis haplótipos a partir do cromossomo Y na população de ovinos no Brasil. Desses haplótipos, três foram verificados neste estudo a partir dos polimorfismos independentes em ChrY (Tabela 2.9).

Os haplótipos em comum identificados foram H5, H6 e H8. O haplótipo H5 está representado pelas raças lanadas Hampshire Down e Île-de-France (McManus *et al.*, 2010), já neste trabalho tanto OPT como OCL apresentaram o haplótipo H5, o que ratifica a origem europeia desses ovinos. O haplótipo H8 corrobora a possível influência de Bergamácia nos rebanhos OPT, pois H8 foi verificado nesta raça por McManus e colaboradores (2010) e, neste trabalho, apenas OPTs possuem este haplótipo. Assim como na literatura, H8 é o haplótipo mais freqüente (McManus *et al.*, 2010). Curiosamente, o haplótipo H6 apresentou-se em apenas um grupo neste trabalho (OCL), enquanto que, em McManus e colaboradores (2010), é o haplótipo presente no maior número de raças diferentes, totalizando seis das dez raças estudadas. Este fato pode apontar as diferenças nas recentes histórias evolutivas próximas de OPT e OCL, demonstrando que OPT já se encontra em um nível diferente de manejo sem compartilhar este haplótipo disseminado na população brasileira. Inclusive, nota-se que neste estudo foi possível verificar o baixo compartilhamento de alelos de raças deslanadas em OPT. Esse evento pode ser consequência de uma possível e recente introgressão de outras raças em OPT, diferentemente do histórico de OCL. O rebanho OCL estudado compartilha H6 que representa boa parte das raças naturalizadas brasileiras com alta miscigenação de raças lanadas e deslanadas.

Na análise das raças de cada sequência usada neste estudo, ou seja, pertencentes à literatura, ao banco do LGA e do *GenBank*, verifica-se a grande influência do origem europeia. Na Figura 2.4, pode-se notar que a maioria das amostras analisadas agrupa-se com a sequência referência H1 juntamente com algumas sequências do *GenBank*. Essas sequências são amostras do haplogrupo B. A partir do estudo do mtDNA de *Ovis aries*, cinco grandes grupos foram identificados, determinando-se assim a origem materna e parte da história da domesticação e migração dos ovinos. Esses grupos foram denominados haplogrupo HA oriundo do Oriente Médio, HB da Europa Ocidental, HC da Ásia, e HD-HE referentes a eventos independentes de domesticação ainda não localizados (Meadows *et al.*, 2011). Assim, verifica-se que a maioria dos OPTs amostrados tem origem em animais trazidos da Europa. Isso corrobora os relatos históricos de fluxo de animais a partir dos colonizadores portugueses para o Brasil.

Quando a correlação dos dados de ND5 é feita com os resultados de Paiva (2005) via outro marcador mitocondrial (D-Loop), verifica-se semelhante influência inicial na origem dos ovinos crioulos. Paiva (2005) por meio do D-Loop observou pela primeira vez de forma molecular a grande contribuição dos ovinos europeus na América Latina pela identificação do Haplogrupo B. Na construção da rede haplotípica da Figura 2.4, observa-se que tanto OPT como OCL estão próximos de haplótipos de animais europeus pertencentes ao Haplogrupo B (Tabela 2.3).

Observa-se também que a rede haplotípica apresenta, em geral, um padrão de estrela com H1, ou seja HB, centralizado. Isso poderia ser indicativo de que os outros haplogrupos são oriundos de HB, já que ND5 conseguiu dividir os demais haplogrupos. Porém, análises do mtDNA completo (Meadows *et al.*, 2011) confirmaram que o haplogrupo central é HA referente ao Crescente Fértil, onde ocorreu o início da domesticação dos animais. Dessa forma, nota-se que ND5 é um marcador capaz de diferenciar haplogrupos, contudo, deve ser associado a outros marcadores para aumentar a acurácia da análise.

Com menor frequência, alguns OPTs foram agrupados com amostras representantes de HD, referentes a H4 na Figura 2.4. Essa é uma possível evidência da influência de animais do Oriente Médio, pois, apesar da atual imprecisão da origem de HD, sabe-se que esse haplogrupo deriva de HA, que como citado anteriormente, é originário do Oriente Médio.

Os dados sobre a origem paterna apontam para origens semelhantes de OPT vistas pelo marcador mtDNA. Na análise dos marcadores ChrY (Tabela 2.9), a origem paterna

foi estudada, sendo verificados quatro haplótipos dos 17 identificados na literatura (Meadows e Kijas, 2009). Verificou-se que H5 foi compartilhado por OPT e OCL, demonstrando uma origem em comum. Esse haplótipo já havia sido identificado em populações de ovinos lanados de origem europeia (McManus *et al.*, 2011), ratificando novamente a influência de animais europeus. O haplótipo mais frequente foi H8 e apenas em OPTs, sendo diagnóstico dessa população. Esse haplótipo foi identificado anteriormente em ovinos Bergamácia Brasileira (McManus *et al.*, 2011), o que seria um indício da introgressão dessa raça em OPTs. Porém, dados anteriores (Paiva *et al.*, 2008) indicam que a influência de Bergamácia não é encontrada em OPT e, sim, em OCL. Assim, mais estudos com OPTs de outras regiões do Pantanal são necessários.

Em relação aos haplótipos identificados a partir do cromossomo Y, mais inferências podem ser feitas. Nas populações analisadas, dos quatro haplótipos identificados, nenhum haplótipo novo foi verificado. No entanto, foram observados haplótipos diagnósticos das duas populações analisadas (OPT e OCL). O haplótipo 6 foi verificado apenas no rebanho OCL. Já na população OPT, foram identificados os haplótipos 8 e 12 (Tabela 2.9). Novamente, a fazenda Uniderp apresenta a maior variabilidade do grupo genético, tornando-se fonte optativa dos haplótipos da linhagem paterna para a Embrapa Pantanal, que apresenta apenas o haplótipo 8.

O tipo e o número de marcadores ChrY confirmaram mais uma vez a maior diversidade observada em Uniderp por mtDNA. Destacou-se a presença do haplótipo 12 exclusivamente em OPTs. Esse haplótipo foi identificado pela primeira vez nos ovinos naturalizados brasileiros neste trabalho. De acordo com Meadows e Kijas (2009), H12 ocorre apenas em ovinos do Oriente Médio. Com a análise completa do mtDNA (Meadows *et al.*, 2011), confirmou-se que o evento central da domesticação de ovinos refere-se ao haplogrupo A de origem nessa região, ou seja, o Crescente Fértil descrito anteriormente (Hyams, 1972). A presença tanto do haplogrupo B de origem europeia como do haplótipo 12 de origem oriental corresponde à própria formação dos rebanhos na América Latina (Paiva, 2005). Essa presença de diferentes origens também corresponde à proposição de alguns autores que indicam um grau elevado de fluxo genético entre populações ovinas europeias e orientais (Meadows *et al.*, 2005), que por fim formaram os ovinos naturalizados brasileiros.

Da mesma forma como nas análises do mtDNA, os dados dos haplótipos identificados por ChrY demonstram uma possibilidade de viés pela amostragem em relação a cada população. Nas análises do ChrY, a baixa amostragem pode ter induzido à baixa

frequência, porém os Núcleos de Conservação estão bem representados pela diversidade haplotípica.

Ainda sobre essa diversidade, ao se realizar a análise de variância molecular da fazenda Uniderp separadamente (contraste II), a variação entre os grupos não foi mais significativa. Isso indica que, no contraste I, a diferenciação entre populações está sendo superestimada pela variabilidade do rebanho Uniderp, que sozinho representou mais da metade das amostras e todos os seis haplótipos. Dessa forma, confirma-se que a maior variação em OPT está ocorrendo entre os indivíduos, não havendo sub-estruturação populacional. Esses resultados ratificam os dados de divergência explicados anteriormente.

Os outros contrastes (III e IV) na análise de variância molecular também demonstram que novamente um grupo isolado, no caso uma população do *GenBank*, está superestimando os índices de fixação. Na Tabela 2.7, foram observados altos valores de diversidade haplotípica ( $0,9204 \pm 0,0373$ ) e diversidade nucleotídica ( $0,01208 \pm 0,00132$ ) das 39 sequências depositadas no *GenBank*. Esses indivíduos foram re-analisados separadamente no programa DNAsp (dados não mostrados) e pôde-se notar que os altos valores estão sendo fortemente influenciados por um grupo específico de 18 sequências (Gonçalves *et al.*, 2010) que apresenta maior quantidade de SNPs que todas as outras amostras (H12-18; Figura 2.4), inclusive, as analisadas neste trabalho.

Além dessa superestimativa, deve-se considerar que os altos valores, de forma geral, dos índices de fixação (Tabela 2.8) encontrados podem estar sendo influenciados pelo pequeno número amostral ou por pressão seletiva. Manejos de monta natural tendem a ser menos seletivos que manejos de inseminação artificial, diminuindo essa pressão. Segundo esses mesmos autores, as fazendas amostradas têm em média 80 cabeças de ovinos, o que representa rebanhos pequenos. Outro aspecto importante para os níveis de endogamia é o tempo de formação dos rebanhos associado ao fato de serem relativamente fechados (Tabela 2.1). Assim, há pouca ou nenhuma troca de material genético, diminuindo a diversidade interpopulacional.

Uma segunda análise de divergência genética foi feita considerando-se grupos diferentes os rebanhos Uniderp, Embrapa Pantanal e um grupo único com todos os outros rebanhos de OPT, além do rebanho OCL e as sequências do *GenBank*, totalizando cinco grupos distintos (Tabela 2.7). As diversidades haplotípicas mantiveram-se semelhantes à primeira análise, porém destaca-se a diversidade do novo grupo, o *GenBank*. Após análise individual dessas sequências, observou-se um forte indicativo de que sua alta diversidade

haplotípica seja resultado de um possível viés de análise. Tal indício pode ser melhor visualizado na rede de haplótipos (Figura 2.4) com uma nítida separação dessas sequências de H12 a H28. Vários grupos de estudos já analisaram a região mitocondrial ND5 em ovinos e são baixos os números de SNPs dentro deste gene (Hiendleder *et al.*, 1998; Burgstaller *et al.*, 2007; Tserenbataa *et al.*, 2004; Meadows *et al.*, 2011). Porém, um único grupo de estudo depositou várias sequências com um alto número de mutações por indivíduo, sendo muitas delas *singletons* ou transversões (Gonçalves *et al.*, 2010), o que destoa do padrão verificado pelos outros trabalhos, inclusive neste estudo. Os haplótipos das amostras analisadas (H1-6) encontram-se próximos tanto da sequência referência como de outras sequências depositadas no *GenBank*. Isto demonstra que a análise realizada neste trabalho foi criteriosa e condiz com a maior parte dos dados deste gene.

Em relação à diversidade genética das amostras analisadas neste trabalho, a variância entre populações dentro dos grupos também é uma fonte significativa de variação apesar de menor. Somando-se esses dados aos encontrados anteriormente a partir de marcadores microssatélites (Paiva *et al.*, 2005), os resultados indicam um certo grau de diferenciação genética de OPT em relação a OCL. Poderia afirmar-se que esses dois grupos são diferentes entre si, de fato, caracterizando duas raças distintas. Porém, novas análises com outros marcadores e, principalmente, com uma maior amostragem são necessárias para uma conclusão mais assertiva.

Em correlação mais direta com a estruturação realizada por microssatélites (Paiva, 2005), percebe-se que o ND5 não foi capaz de agrupar os OPTs de modo tão claro como antes. Porém, a divisão por haplótipos observada neste estudo segue a mesma tendência. Verificou-se que a maior parte dos animais, que foi agrupada em dois grandes grupos, estruturou-se também em dois grupos distintos de haplótipos (H1/H2 e H3, ANEXO A – SUBESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE OPT POR DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES). É interessante notar que os haplótipos 1 e 2 diferem-se em apenas um SNP enquanto que H3 está mais distante da sequência referência, refletindo assim a maior diferença destes animais em relação aos outros dois haplótipos. Esses são indícios de que os dados de ND5 corroboram a análise feita por Santos (2005) e apontam a maior semelhança de animais de um mesmo local de coleta em relação a outro ponto de amostragem. Tal informação é primordial para o manejo de manutenção da variabilidade genética através da troca de animais entre fazendas, reduzindo a consanguinidade local.

Sobre o Núcleo de Conservação da Embrapa Pecuária Sul e o Núcleo em formação da Fazenda Nhumirim/Embrapa Pantanal, deve-se prestar especial atenção. As menores diversidades haplotípicas e nucleotídicas foram encontradas exatamente em rebanhos que deveriam ser representativos, ainda que pequenos (Tabela 2.6). Além da baixa diversidade, ambos apresentam os mesmos três haplótipos (H1-3). Tais eventos podem estar acontecendo em virtude de problemas de manejo dos rebanhos de conservação. Porém, essa possa não ser a razão principal, já que a Embrapa Pecuária Sul mantém um controle rígido de manejo nos últimos cinco anos. Outra explicação da baixa diversidade encontrada por meio do marcador mitocondrial seria a diferente taxa de fixação do DNA nuclear e mitocondrial. Na maioria das criações de animais domésticos, o fluxo gênico é mediado pelos machos através da troca de reprodutores ou pela compra de sêmen. Como a herança mitocondrial é materna, a introdução de novos machos nos rebanhos influencia apenas o genoma nuclear, aumentando assim a taxa de fixação entre diferentes grupos. Por fim, deve-se levar em consideração mais uma vez o tamanho amostral, que também foi baixo, podendo subestimar as análises. Adicionalmente, o rebanho Nhumirim/Embrapa Pantanal é muito recente de forma que ainda se encontra em formação, refletindo a baixa amostragem. Neste sentido, os resultados deste estudo podem auxiliar efetivamente na otimização da estruturação da Fazenda Nhumirim.

Sugere-se que os marcadores moleculares sejam usados para a formação de famílias dentro dos rebanhos e para o monitoramento dos acasalamentos. A região mitocondrial do gene ND5 analisada neste trabalho junto com os marcadores microssatélites usados anteriormente podem fornecer informações seguras para essas fazendas, nas quais a escrituração zootécnica dos rebanhos não é prática regular, dificultando o acompanhamento de pedigree. Desta forma, a introdução de reprodutores diversificados nos Núcleos de Conservação pode ser direcionada. Em seguida, o rodízio de machos entre as famílias pode inicialmente aumentar essa diversidade e, com pouco tempo, reduzir os índices de endogamia. Por fim, o Núcleo de Conservação da Embrapa Sul de rebanho OCL deve ser monitorado cada vez mais. Isso é desejável, já que a população OCL apresenta haplótipos compartilhados com os animais OPT, situação que deve ser evitada a princípio.

Outro ponto importante a ser considerado na interpretação dos resultados é a baixa quantidade de SNPs encontrados no marcador mitocondrial investigado. Quanto maior a área analisada do material genômico, maior é, em geral, a informatividade dos dados (Schlötterer, 2004), podendo gerar um agrupamento mais acurado das populações. Este tipo

de preocupação foi considerado no desenho deste trabalho inicialmente. Porém, como explicado em outro item, não foi possível a otimização das PCRs do CytB e do D-Loop. Portanto, trabalhos anteriores do LGA como os citados anteriormente foram considerados na interpretação deste estudo.

Apesar do marcador ND5 não apontar grande diferenciação entre OPT e OCL, as análises de divergência e de variância molecular mostram bons indicadores de manejo. A variância genética distinta, ainda que moderada, em OPT pode ser usada no sentido de troca e fluxo gênico deste recurso genético, especialmente do rebanho Uniderp que apresentou toda a variabilidade genética de OPT neste gene com todos os seis haplótipos identificados. Além disso, embora a análise através do ND5 tenha permitido pouca diferenciação entre as populações analisadas, pôde-se detectar a presença de dois haplótipos exclusivos de OPT. O haplótipos 5 e 6 podem ser usados para diagnosticar populações deste grupo genético. Deve-se considerar também que o ND5 mostrou-se um marcador de fácil acesso, podendo apresentar resultados rápidos a custos relativamente baixos.

Assim, esses resultados indicam, de fato, que o marcador ND5, por si só, não é muito informativo (e.g., Meadows *et al.*, 2010) e não foi capaz de determinar se a população de ovinos Pantaneiros apresenta diferenciação genética suficiente para caracterizá-la como raça distinta da Crioula. Como alguns estudos destacam diferenças fenotípicas notórias dos OPTs, é necessário que se continuem as investigações do genoma a fim de estudar tais características e poder aproveitá-las tanto em termos de conservação como para fins comerciais.

O uso de ND5, no entanto, pode ser recomendado para monitoramento especialmente de rebanhos fechados. Núcleos de conservação *in situ* podem a partir deste marcador associado a outros, como microssatélites, e favorecer assim a formação adequada de famílias, o correto rodízio de macho e/ou de fêmeas e a troca ou o descarte de animais quando necessário. Para uma manutenção adequada de núcleos de conservação é, em geral, importante manter uma alta diversidade dos representantes de uma espécie no menor tamanho populacional possível. Isto aumenta a chance de conservar a espécie e/ou raça em questão e reduz custos com o menor número de animais e estrutura. Outra vantagem é que sendo mais representativo o rebanho de um núcleo de conservação *in situ* pode auxiliar futuros eventos de intercâmbio de germoplasma de forma que estes genótipos sejam melhor caracterizados do ponto de vista adaptativo e produtivo. Também, núcleos de conservação *ex situ* podem usar

esse marcador molecular para a melhor formação e acompanhamento de seus bancos de germoplasma.



## 5. CONCLUSÕES

As análises realizadas são indicativas de diferenciação entre OPT e OCL, mas ainda não são conclusivas para o entendimento geral do grupo ovino Pantaneiro. A análise inconclusiva pode ser reflexo do marcador mitocondrial utilizado, que mostrou ser de baixa informatividade além da amostragem regionalizada de rebanhos, em sua maioria, fechados. Contudo, os dados apontam para a real possibilidade de OPT ser classificado como raça após análises adicionais com outros marcadores moleculares.

Sobre a diversidade genética de OPT, verificou-se que os rebanhos analisados representam uma única população. Observou-se também que o rebanho Uniderp apresentou toda a variabilidade de OPTs observados neste estudo à exceção de H8 para o cromossomo Y. Esse rebanho pode ser utilizado como fonte de animais e/ou germoplasma, subsidiando assim programas de conservação de OPTs realizados pela Embrapa Pantanal e, futuramente, de melhoramento. Entretanto, todos os rebanhos apresentam baixa diversidade de forma que se sugere que os estudos do LGA sobre OPT sejam considerados para os próximos acasalamentos e/ou troca de germoplasma, bem como na coleta e formação de bancos de DNA.

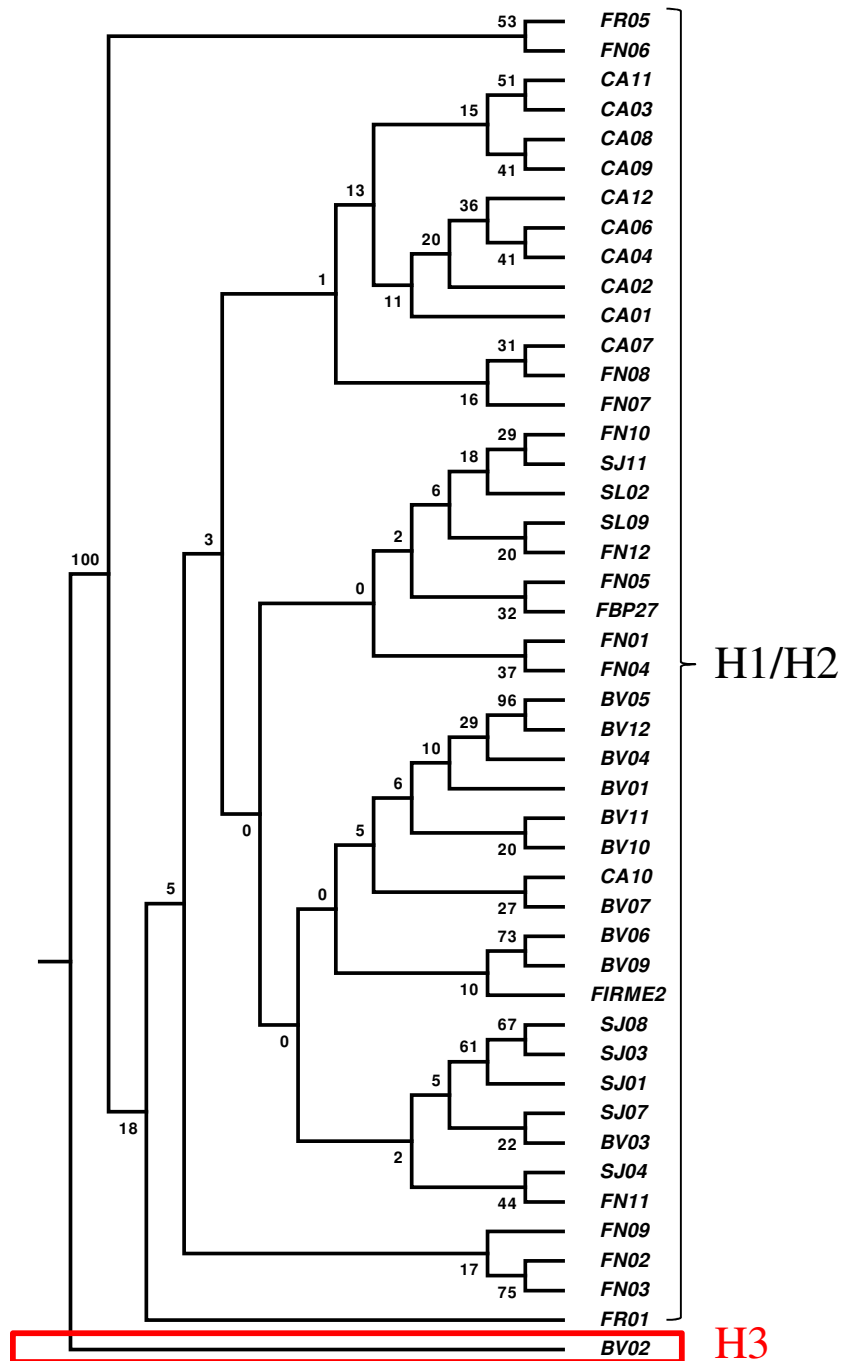
Em relação à formação desses ovinos, a análise em conjunto dos três marcadores demonstrou a maior influência de animais de origem europeia. Também foi identificada a influência de ovinos do Oriente Médio. A introgressão de ovelhas Bergamácia precisa de maior análise, pois diferentes marcadores mostraram informações inconclusivas. O estudo mostrou que os marcadores podem ser usados para monitorar rebanhos ovinos em formação de famílias e fluxo genético, por exemplo, porém o uso deve ser associado a outros marcadores genéticos para maior acurácia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDEL, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Mol Biol Evol** 16.1 (1999): 37-48.
- BOYCE, T.M.; ZWICK, M.E.; AQUADRO, C.F. Mitochondrial DNA in the Bark Weevils: Size, Structure and Heteroplasmy. **Genetics** 123.4 (1989): 825-36.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10.3 (2010): 564-67.
- FRAZILIO, F.O. **Perfil Das Proteínas Séricas E Da Contagem Leucocitária Em Ovinos Com Infecção Helmíntica Naturalmente Adquirida**. f. 48. Mestrado em Produção e Gestão Agroindustrial, Universidade para o desenvolvimento do estado e da região do Pantanal, 2005.
- HADJIPAVLOU, G.; MATIKA, O.; CLOP, A. *et al.*, Two Single Nucleotide Polymorphisms in the Myostatin (GDF8) Gene Have Significant Association with Muscle Depth of Commercial Charollais Sheep. **Animal Genetics** 39 (2008): 346-353.
- HAYES, B.J.; BOWMAN, P.J.; CHAMBERLAIN, A.J. *et al.*, Accuracy of Genomic Breeding Values in Multi-Breed Dairy Cattle Populations. **Genetics, Selection, Evolution** 41, (2009): 51.
- HIENDLEDER, S.; MAINZ, K.; PLANTE, Y. *et al.*, 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** 89.2 (1998): 113.
- HYAMS, E. **Animals in the service of man, 10,000 years of domestication**. Londres: J. M. Dent & Sons Ltd, 1972.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. Dnasp V5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. **Bioinformatics** 25.11 (2009): 1451-2.
- MARIANTE, A.daS.; ALBUQUERQUE, M.; DO EGITO, A.A. *et al.*, Advances in the Brazilian Animal Genetic Resources Conservation Programme. **Animal Genetic Resources Information** 25 (1999): 107-22.
- MARIANTE, A.daS.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: Raças Domésticas da História do Brasil**. Embrapa Sede, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, 232 p. 2006.
- MEADOWS, J.R.S.; HAWKEN, R.J.; KIJAS, J.W. Nucleotide Diversity on the Ovine Y Chromosome. **Animal Genetics** 35.5 (2004): 379-85.
- MEADOWS, J.R.S.; CEMAL, I.; KARACA, O. *et al.*, Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified from Sheep Breeds of the near East. **Genetics** 175.3 (2007): 1371.

- MEADOWS, J.R.S.; HIENDLEDER, S.; KIJAS, J.W. Haplogroup Relationships Between Domestic and Wild Sheep Resolved Using a Mitogenome Panel. **Heredity** 106 (2011): 700–706.
- MEADOWS, J.R.S.; KIJAS, J.W. Re-Sequencing Regions of the Ovine Y Chromosome in Domestic and Wild Sheep Reveals Novel Paternal Haplotypes. **Animal Genetics** 40.1 (2009): 119–23.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. **Nucleic Acids Res** 16.3 (1988): 1215.
- PAIVA, S.R. **Caracterização Da Diversidade Genética De Ovinos No Brasil Com Quatro Técnicas Moleculares**. f. 108. Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- PEDROSA, S.; UZUN, M.; ARRANZ, J.J. *et al.*, Evidence of Three Maternal Lineages in near Eastern Sheep Supporting Multiple Domestication Events. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 272.1577 (2005): 2211.
- PÉREZ-PARDAL, L., ROYO, L. J., BEJA-PEREIRA, A. *et al.*, Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos taurus*) cattle. **Animal Genetics** 41 (2010): 232–241.
- PETIT, E.; BALLOUX, F.; EXCOFFIER, L. Mammalian Population Genetics: Why Not Y? **Trends in Ecology & Evolution** 17.1 (2002): 28–33.
- SANTOS, S.A. **Caracterização Do Sistema De Criação e Das Raças De Ovinos Naturalizadas Da Planície Pantaneira**. Embrapa Pantanal, 2005.
- SCHLÖTTERER, C. The Evolution of Molecular Markers-Just a Matter of Fashion? **Nature Reviews Genetics** 5.1 (2004): 63–69.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.*, Mega5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Biol Evol** 28.10 (2011): 2731–9.
- TSERENBATAA, T.; RAMEY, R.R.; RYDER, O.A. *et al.*, A Population Genetic Comparison of Argali Sheep (*Ovis Ammon*) in Mongolia Using the Nd5 Gene of Mitochondrial DNA; Implications for Conservation. **Molecular ecology** 13.5 (2004): 1333–39.

**ANEXO A**  
**SUBESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL DE OPT**  
**POR DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES**



**Figura A.1** Dendrograma obtido com algoritmo Neighbor joining a partir da matriz de número de alelos compartilhados entre 46 animais do grupo genético crioulo do Pantanal. Números entre os nós correspondem a valores de consistência interna (bootstrap). Nota-se que a maior parte dos animais, que foi agrupada por microssatélites em dois grandes grupos, estruturou-se também em dois grupos distintos de haplótipos por ND5 (H1/H2 e H3). SL = Santa Luzia; FB = Baía das Pedras; FN = Guaçuzinho; FR = Rancharia; SL = Santa Luzia; SJ = São Joaquim; CA = Campo Alto; BV = Firme. Adaptado de Paiva e colaboradores (2008).