



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

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA PARA COLORAÇÃO DE
PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA**

MARIA MALANE MAGALHÃES MUNIZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2015**

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

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA PARA COLORAÇÃO DE
PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA**

Aluna: Maria Malane Magalhães Muniz

Orientador: Samuel Rezende Paiva

Co-Orientador: Alexandre Rodrigues Caetano

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 131/2015

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2015**

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

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA PARA COLORAÇÃO DE
PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA**

MARIA MALANE MAGALHÃES MUNIZ

**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.**

APROVADO POR:

**SAMUEL REZENDE PAIVA, DOUTOR (EMBRAPA)
(ORIENTADOR)**

**CONCEPTAMCMANUSPIMENTEL, PHD (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**OLIVARDO FACÓ, DOUTOR (EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 06 de março de 2015

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MUNIZ, M. M. M. Estudo de associação ampla do genoma para coloração de pelagem em ovinos da raça Morada Nova. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 65 p. 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 acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o 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

MUNIZ, M. M. M. Estudo de associação ampla do genoma para coloração de pelagem em ovinos da raça Morada Nova. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2015.

1. GWAS. 2. Pigmentação de pelagem. 3. Ovinos Morada Nova.
4. Conservação animal. 1. Paiva, S. R. II. Estudo de associação ampla do genoma para coloração de pelagem em ovinos da raça Morada Nova.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente tenho que agradecer Deus pela sua imensa bondade e misericórdia e a Nossa Senhora pela sua intercessão poderosa que tanto tem me dado forças e coragem a cada degrau de vida.

Aos meus pais, Lúcia e Manoel, por todos os ensinamentos e por terem sido essenciais na minha formação pessoal.

A minha irmã pela amizade e companheirismo. Obrigada por estar sempre presente na minha vida, mesmo que distante fisicamente.

Ao meu irmão que me cativa a ser exemplo para ele a cada dia, almejando torná-lo um homem de bem. Apesar dos pesares o amo imensamente.

A todos os meus familiares, tios, primas, primos, avós, muito obrigada por todo o apoio.

Á todos os amigos conquistados nesse período, obrigada pelo companheirismo, por estarem presente nas festas, no trabalho e também em horas não muito felizes. Aos amigos do LGA- CENARGEN: Luciana, Lilian, Caliandra, Renato, Natália Toledo, Gleison e Naiara, sou muito grata a todos por toda a ajuda, ensinamentos, caronas, hospedagens e etc. Em especial, quero agradecer a Luciana e a Lilian, jamais conseguirei pagar tudo que fizeram por me nesse período. Natália, não tem como agradecer sua disponibilidade e ajuda. Muitíssimo obrigada, estará sempre a sua disposição para o que precisar. Aos companheiros de alojamento: Eleonora, José Felipe, Carolle, Vladinis, Renato, Nayara, Nathália, Oscar, Mateus, Luzia Renata, Anelise, Thaís, Netto e João e aos demais que fizeram parte da turma nesse período, não poderei citar a todos, mais serão sempre lembrados, sou imensamente grata a todos por todas as partilhas, companheirismo e amizade. Nayara Kussano, muitíssimo obrigada por todas as caronas e pôr está sempre à disposição para ajudar e partilhar inclusive as comidas maravilhosas feitas por sua mãe. Querida Thaís, és muito querida, agradeço a

Deus por sua amizade. João Ricardo, obrigada por todo o companheirismo e força, obrigada por me apoiar sempre, sou muito grata a Deus por tido você do meu lado.

Não poderia deixar de agradecer a todos os funcionários da Fazenda Sucupira e do PCG- Cenargen pelo profissionalismo, presteza e amizade. Em especial ao Dr. Alexandre Floriani, por sua disponibilidade e apoio sempre que precisei.

Ao meu Orientador, PhD. Samuel Rezende Paiva por todos os ensinamentos passados, paciência, disponibilidade e ajuda sempre que precisei. MUITÍSSIMO obrigada.

Ao meu Co-Orientador PhD. Alexandre Rodrigues Caetano, pelas orientações, sugestões e disponibilidade, suas contribuições foram essenciais.

A todos os professores pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade e contribuição para minha formação profissional.

A professora PhD. Concepta McManus Pimentel por sua disponibilidade e apoio e também por aceitar o convite de compor a banca de avaliação.

A Professora Dra. Débora Andréa Evangelista Façanha, pelas amostras fornecidas, pelos conhecimentos compartilhados, sou muito grata.

Ao Doutor Olivardo Facó, por sua disponibilidade e apoio para o desenvolvimento desse trabalho desde o início, pelos conhecimentos compartilhados e por aceitar o convite de compor a banca de avaliação.

À Universidade de Brasília, em especial a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária pela oportunidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro essencial neste período.

ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Problemática e Relevância	2
1.2. Objetivo	4
1.2.1. Objetivo Geral	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Melhoramento Genético Participativo	5
2.1.1. Origem da Raça Morada Nova	6
2.1.2. Núcleo de Conservação e Melhoramento Genético Participativo de Ovinos da Raça Morada Nova	9
2.2. Controle Genético dos Mecanismos de Pigmentação	10
2.3. Implicações do Padrão Racial na Seleção	14
2.4. Estudo de Associação Ampla do Genoma (GWAS)	15
CAPÍTULO II - ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA PARA COLORAÇÃO DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA	
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Amostragem	23
2.2. Coleta, Processamento e Armazenamento	24
2.3. Extração e Quantificação de DNA	25
2.4. Genotipagem	25
2.5. Controle de Qualidade	25
2.6. Análises de Estratificação de População	26
2.7. Análises de Associação de Genômica	27
2.8. Sequenciamento de Fragmentos do gene MC1R	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
3.1. Resultados	28
3.1.1. Controle de Qualidade	28
3.1.2. Análises de Estratificação da População	29
3.1.3. Análise de Associação Genômica	31
3.2.3. Sequenciamento de Fragmentos do gene MC1R	37
3.2. Discussões	38
4. CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
1. Conclusões e Direcionamentos Futuros	43
2. Referências Bibliográficas	45

RESUMO

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA PARA COLORAÇÃO DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA. Maria Malane Magalhães Muniz¹. Samuel Rezende de Paiva².

1 – Mestranda na UnB, Brasília/DF

2 – Pesquisador Embrapa Labex EUA – Secretaria Relações Internacionais

A Associação brasileira dos criadores de ovinos (ARCO) reconhece duas variedades da raça Morada Nova, a branca e a vermelha. Entretanto, existe uma variedade negra que vem sendo frequentemente eliminada dos rebanhos por ser desclassificada para fins de registro genealógico. Estudos anteriores da equipe sugerem que esta variedade é muito similar a variedade vermelha. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise de GWAS (Genome-wide association study) para identificação de regiões genômicas relacionados à coloração de pelagem e para confirmar o posicionamento da variedade negra em relação às demais variedades de ovinos dessa raça. Foram analisados 61 animais (branco= 20; negra= 20; vermelha= 21), genotipados para OvineSNP50kBeadChip, contendo 54.241 marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism). No controle de qualidade, excluí-se amostras com call rate < 80 %; amostras outliers, quanto as taxas heterozigosidade autossômica, foi calculado as faixas de 1,5 interquartis (IQR); excluí-se amostras idênticas ou animais com mais de 50% de semelhança (IBD; PCA e Fst); SNPs sem posições definidas nos cromossomos; marcadores monomórficos; SNPs com Call rate < 90 %; Frequência do menor alelo(MAF) <0,0001 e os cromossomos sexuais. Analisou-se a associação para diferenciação de pelagem entre a variedade negra das pelagens vermelha e branca, bem como a diferenciação entre animais negros e vermelhos. Após o controle de qualidade obteve-se um conjunto de dados de 45.982 SNPs e 48 amostras, (negra= 18; brancas= 13; vermelha= 17). Para GWAS utilizou-se o modelo dominante, teste qui-quadrado corrigido para o controle genômico. O SNPs mais significativo nos GWAS foi o s26449.1, esse SNP encontra-se a uma distância de 163.5 kb do gene MC1R. Esse gene parece ter papel fundamental no processo de diferenciação de pelagem da variedade negra das demais pelagens para raça Morada Nova.

Palavras - Chave: *Ovis aries*, recursos genéticos animais, pigmentação de pelagem, MC1R

ABSTRACT
GENOME WIDE ASSOCIATION FOR PIGMENTATION IN SHEEP MORADA NOVA. Maria Malane Magalhães Muniz. Samuel Rezende de Paiva (Orientador).

The Brazilian Association of sheep creators (ARCO) acknowledge two varieties for the Morada Nova, white and red. However, the black variety is often eliminated flocks to be disqualified for genealogical record purposes. In previous team study suggests that this variety is very similar to red variety. Thus, the aim of this study was to conduct an analysis of GWAS (Genome-wide association study) to identify genomic regions related to coat color and to confirm the position of the black variety compared to other varieties of sheep that breed. Were used 61 animals (white = 20; black = 20; red = 21), genotyped for OvineSNP50kBeadChip containing 54,241 markers of type SNP (Single Nucleotide Polymorphism). In quality control, is excluded samples with call rate <80%; outliers samples, as autosomal heterozygosity rates, we calculated the 1.5 interquartile ranges (IQR); excludes identical samples or animals over 50% similarity (IBD; PCA and Fst); SNPs without defined positions on chromosomes; monomorphic markers; SNPs with call rate <90%; deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) <0.0001 and the sex chromosomes. We analyzed the association to coat differentiation between the red and black varieties and differentiation between white and non-white animals. After quality control obtained a set of data 45982 SNPs and 48 samples (black = 18, white= 13, red = 17). For GWAS used the dominant model, chi-square test corrected for genomic control. The SNP most significant in GWAS was the s26449.1, this SNP is located at a distance of 163.5 kb MC1R gene. This gene seems to have ground coat role in differentiation process of the black variety of other coats for Morada Nova.

Keywords: *Ovis aries*, animal genetic resources, coat pigmentation, MC1R.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa e Relevância

A raça Morada Nova é uma das principais raças de ovinos do Brasil, destaca-se por apresentar pele de excelente qualidade, alta prolificidade, fertilidade, precocidade sexual, rusticidade, habilidade materna e por serem animais de pequeno porte, sendo esta uma importante característica em sistemas de produção com restrições na disponibilidade de alimentos impostas por fatores climáticos (Facó et al., 2008). Apesar de sua importância para os sistemas de produção brasileiros, principalmente para a região Nordeste, vinha se observando uma redução no número de criatórios da raça e consequentemente uma diminuição no tamanho efetivo da população (Arandas et al., 2012).

A Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos (ARCO) reconhece duas variedades para a raça, a variedade vermelha e a variedade branca, sendo comum o aparecimento de animais negros nos rebanhos. Esses animais são rapidamente eliminados, por não estarem de acordo com padrão racial estabelecido para a raça. Dessa forma, os produtores têm utilizado o padrão racial como critério de seleção nos rebanhos, esses tem encontrado dificuldade em selecionar animais que se adéquem plenamente a todas as características. A equipe técnica do Núcleo de Melhoramento Genético Participativo da Raça Morada Nova observou que o número de animais restantes após a seleção para características raciais tem sido suficiente apenas para cobrir as taxas de reposição dos rebanhos. Assim, não tem sido possível o estabelecimento de qualquer índice de seleção para características produtivas, o que tem limitado o progresso genético da raça. Observou-se ainda que a descaracterização racial para a cor da pelagem está entre as características que mais contribuem para o aumento das taxas de descarte de animais.

As novas tecnologias de genotipagem de marcadores SNPs a partir de microarranjos permitiram um grande avanço nos estudos de associação ampla do genoma (GWAS) e tem contribuído para o aumento da compreensão da relação entre o genoma de animais domésticos e seus fenótipos (Kijas et al., 2013). Várias metodologias têm sido desenvolvidas para lidar com o enorme volume de dados genotípicos conseguidos com as novas tecnologias de genotipagem e assim identificar com precisão regiões do genoma que desempenham papel importante em determinadas características. Os estudos de GWAS têm sido empregados para a investigação de várias características complexas e doenças em espécies animais. Para a espécie ovina tem sido utilizado na investigação de doenças como raquitismo, na avaliação de crescimento e produção de carne, bem como para características qualitativas como herança de chifres e cor de pelagem (Zhao et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Visando dar suporte ao núcleo de melhoramento participativo de ovinos da raça Morada Nova, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo de associação ampla do genoma (GWAS) para a coloração de pelagem na raça Morada Nova e assim identificar regiões, genes e SNPs responsáveis pela diferenciação de cores na raça.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Realizar um Estudo de Associação Ampla do Genoma (GWAS - Genome-Wide Association Study) para identificação de marcadores SNPs relacionados à coloração de pelagem em ovinos da raça Morada Nova.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar estudo de associação ampla do genoma para contrastes de variedades de pelagem dentro da raça Morada Nova (preta *vs* vermelha +branca) e (vermelha *vs* negra) de forma a identificar marcadores SNPs que influenciam a expressão fenotípica da pelagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Melhoramento Genético Participativo

Programas de melhoramento genético bem estruturado são fundamentais para aumentar a produtividade e da rentabilidade dos sistemas de produção, bem como para manter a diversidade genética, financiar a conservação e utilização dos recursos genéticos específicos de forma sustentável. Porém, o que tem sido observado nos últimos anos é que pouco sucesso se tem conseguido com esse tipo de ação e o impacto desses programas tem sido muito pequeno em países em desenvolvimento (FAO, 2007). Um dos motivos da ineficiência desses programas dá-se pelo grande enfoque empregado em pesquisas subutilizadas, em sua maioria pela falta de interação dos resultados destas com o setor produtivo, com comunidades e criadores que tenham uma visão produtiva dos sistemas locais. Por isso, os programas acabam sendo integralmente pagos pelo setor público sem que isso gere um retorno notável para as comunidades locais bem como para conservação de raças localmente adaptados. O que implica em uma maior necessidade de exploração as diversas formas de conservação, considerando a diversidade genética, a variabilidade dos recursos genéticos, mais também a viabilidade econômica, os benefícios sociais, ou seja, buscar por estratégias não onerosas e eficientes, capazes de conciliar conservação, melhoramento genético e utilização dos recursos genéticos locais.

O melhoramento genético participativo é uma das formas de conservação de raças localmente adaptadas que tem apresentado bons resultados em vários países. Essa forma de melhoramento envolve os conhecimentos populares, técnicos e acadêmicos, portanto, todo o direcionamento desses programas é norteado

pela interação entre essas diferentes formas de conhecimento, estimulando o desenvolvimento de programas condizentes com as reais condições das comunidades (Mirkena et al.,2012). É uma forma de estimular e conscientizar a população local da importância de cada ação dentro do programa para o desenvolvimento científico, social e econômico local.

No Brasil, são poucos os programas de melhoramento genético para ovinos, esses poucos são programas pequenos e com objetivos particulares, conduzidos por empresas privadas ou conduzidos por instituições de pesquisa, vinculados à conservação dos recursos genéticos locais. Quanto aos programas de melhoramento genético participativo, é um tema pouco conhecido e pouquíssimo praticado no Brasil. Talvez, o programa de melhoramento genético participativo de ovinos da raça Morada Nova, seja um dos raros programas de melhoramento genético participativo no Brasil, bem como a raça Morada Nova seja uma das poucas raças que tenha um envolvimento sociocultural com uma determinada comunidade, assemelhando-se as relações encontradas entre comunidades e raças locais em outros países.

2.1.1 Origem da Raça Morada Nova

A raça Morada Nova foi apresentada por Domingues (1941) em uma nota sobre o “Carneiro Deslanado de Morada Nova” com o seguinte trecho: “Viajando em 1937, em missão oficial do D.N.P.A. verifiquei a ocorrência de um tipo étnico interessante, entre os ovinos nativos do Nordeste, e que se caracteriza pela ausência de lã, de modo que os animais, ao contrário dos de sua espécie, apresentam a pele coberta de pelo cabrum – grosseiro e curto. Assim são criados para a produção de pele (exportada largamente) e para carne, *in loco* consumida”. Nesta mesma nota, Domingues (1941) constatou a ocorrência de ovinos deslanados em Morada Nova, onde ocorria com maior frequência no Ceará, Piauí e em vários outros pontos do Nordeste.

Seguindo em sua descrição, Domingues (1941) caracteriza os “Carneiros Deslanados de Morada Nova” como animais com peso médio de 30 kg, destacando que tal observação se dera na época seca, com 65-78 cm de perímetro

torácico, altura de 60-65 cm e coloração predominantemente vermelha lisa, podendo ocorrer ainda a branca e a pintada, sendo as fêmeas mochas e os machos com ou sem chifres. Depois vieram vários questionamentos acerca de como teria se originado essa raça, Domingues (1954) supõe que a raça Morada Nova descenderia diretamente dos carneiros Bordeleiros de Portugal, trazidos para o Brasil na época da colonização e que, desde então, teriam passado por um processo de seleção natural que resultara na ausência de lã, desconsiderando a hipótese de que essa raça descenderia de animais de africana.

Com o surgimento de novas técnicas de manipulação de material genético, surge também novas possibilidades para estudos da origem da raça Morada Nova, assim como a origem de outras raças naturalizadas brasileiras. Paiva et al. (2005), estudando haplótipos de DNA mitocondrial em animais de todas as raças localmente adaptadas brasileiras, classificaram esses animais como de origem europeia, considerando a provável origem africana para as raças Somalis Brasileira e Morada Nova. Estes sugeriram que as raças africanas poderiam apresentar uma história evolutiva semelhante à das raças europeias, compartilhando o mesmo haplótipo mitocondrial. Kijas et al. (2012) utilizaram um chip com aproximadamente 50.000 marcadores SNPs para identificar a origem das raças localmente adaptadas brasileiras, chegaram à conclusão de que as raças brasileiras realmente apresentam duas fontes de variabilidade genética principal, ou seja, uma de origem europeia e uma de origem africana. Ferreira et al. (2014) estudaram a diferenciação genética entre as variedades de ovinos da raça Morada Nova, encontrando diferenças significativas entre as variedades vermelha e branca. Esses resultados reforçam a necessidade de estudos com várias classes de marcadores moleculares, bem como, uma amostragem ampla para que se conheçam realmente as origens das raças naturalizadas brasileiras. Os recursos genéticos de um país ou região constituem um patrimônio cultural e biológico único, fazem parte de sua riqueza.

Em 1977 o Ministério da agricultura reconheceu oficialmente a raça Morada Nova. Atualmente a Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos (ARCO) reconhece duas variedades para a raça: a variedade branca e a vermelha (Figura 1. 1). (ARCO, 2014).



Figura 1.1 Ovinos Morada Nova nas variedades branca e vermelha. Fotos: Débora A. E. Façanha (a); Arquivo pessoal(b)

De acordo com Associação dos Criadores de Ovinos (ARCO, 2014), o padrão atual para a raça é definido da seguinte forma:

Aspecto geral: Animais deslanados, mochos, de pelagem vermelha ou branca; machos com 40/60 kg; fêmeas adultas com 30/50 Kg.

Cabeça: Larga, alongada, perfil subconvexo, focinho curto bem proporcionado, orelhas bem inseridas na base do crânio e terminando em ponta; olhos amendoados.

Pescoço: Bem inserido no tronco, com ou sem brincos.

Corpo: Linha dorso-lombar reta, admitindo-se ligeira proeminência de cernelha nas fêmeas. Garupa curta com ligeira inclinação. Cauda fina e média; não passando dos jarretes.

Membros: Finos, bem aprumados, cascos pequenos e escuros.

Pelagem: De acordo com a variedade: a) Variedade Vermelha - Pelagem vermelha em suas diversas tonalidades; cor mais clara na região do períneo, bolsa escrotal, úbere e cabeça. A presença de sinais pretos não desclassifica. Pele escura, espessa, elástica e recoberta de pelos curtos, finos e ásperos. Mucosa escura. Cauda com ponta branca. b) Variedade Branca - Pelagem branca, sendo permissíveis mucosas e cascos claros. Pele escura, espessa, elástica e resistente.

Aptidões: Produção de carne e peles de alta qualidade. Ovelhas muito prolíferas.

Adaptação: Ovelhas muito rústicas que se adaptam às regiões mais áridas; desempenha importante função social fornecendo alimentos proteicos às populações rurais destas regiões.

Defeitos: Pelagem atípica, descaracterizada; Manchas de qualquer cor sobre as pelagens branca ou vermelha; Pelos atípicos; Mucosas e cascos despigmentados; Pele

excessivamente fina; Constituição débil; Má conformação e aprumos defeituosos; Presença de chifres; Barba e toalha (babeiro); Orelhas grandes e pendentes; Más formações bucais (prognatismo, retrognatismo); Lordose, cifose e escoliose; Cauda excessivamente grossa, curta ou mais de 25% de cor branca; Criptorquidia, monorquidia, hipoplasia ou acentuada assimetria testicular.

2.1.2 Núcleo de Conservação e Melhoramento Genético Participativo de Ovinos da Raça Morada Nova

O Núcleo de Conservação e Melhoramento Genético da Raça Morada Nova foi iniciado em 2007, coordenado pela Embrapa Caprinos e Ovinos e o com o apoio financeiro do Banco do Nordeste do Brasil (Facó, 2008). As iniciativas para esse projeto surgiram em 2006 quando criadores dos municípios de Morada Nova, Limoeiro do Norte e Jaguaretama e outras localidades vizinhas no Estado do Ceará, manifestaram à prefeitura de Morada Nova e ao SEBRAE a preocupação com a redução do número de produtores e com o tamanho efetivo de ovinos desta raça. Estas instituições procuraram a Embrapa para relatar o interesse dos criadores em encontrar ajuda técnica para que pudessem revitalizar a produção de ovinos da raça. Na ocasião, a Embrapa Caprinos e Ovinos propôs aos criadores a formação de grupo para trabalharem coletivamente sobre orientação técnica do Programa de Melhoramento Genético de Ovinos e Caprinos de Corte (GENECOC) e implantar o núcleo de melhoramento da raça na localidade de Morada Nova (Shiotisuki & Facó, 2013).

Para estabelecer o objetivo de seleção do projeto foram realizadas reuniões entre os criadores e a equipe técnica do projeto e de forma participativa foi definido que melhorar a velocidade de crescimento e a precocidade de acabamento era os objetivos de seleção, preservando o padrão racial, a prolificidade, habilidade materna e a adaptabilidade da raça as condições de semiárido (Shiotisuki & Facó, 2013). Desde então, as ações desenvolvidas dentro do núcleo têm sido resolvidas de forma coletiva, atualmente todas as fazendas participantes realizam escrituração zootécnica. O programa conta com fichas padrões para os diferentes tipos de manejo nos rebanhos, o que facilitam a coleta de dados pelo produtor. Para dá agilidade e credibilidade as informações coletas, um técnico faz visitas periódicas às fazendas participantes e auxilia essas coletas.

Nesses anos de existência do Núcleo, muitos progressos para a conservação e desenvolvimento produtivo da raça foram conseguidos, a destacar a revitalização da Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos da Raça Morada Nova, que passou um longo período desativo e que agora tem desempenhado um papel importante nos trabalhos de divulgação da raça. Através dessa integração entre produtores, pesquisadores e associação, foi possível verificar que as características definidas no padrão racial parecem ser um fator limitante no melhoramento genético da raça. As altas taxas de descarte por descaracterização para fins de registro genealógico têm influenciado diretamente os níveis de pressão de seleção utilizados nos rebanhos, considerando que os animais restantes para seleção após os descartes de animal com descaracterização racial são suficientes apenas para a reposição de reprodutores (Muniz et al., 2012). Dessa forma, serão necessárias maiores investigações para caracterizar as implicações desses descartes no processo de melhoramento genético da raça.

2.2 Controle Genético dos Mecanismos de Pigmentação

A cor da pelagem é uma das características mais marcantes nos mamíferos, é também uma das características que apresenta grande diversidade entre as espécies, bem como dentro de espécie (Ren et al., 2011). A variação de cor depende da distribuição e do tipo pigmentos produzido. Esses fatores são geralmente controlados por mais de um gene. As variações de coloração de pelagem encontrados nos animais fornecem oportunidades para estudos da base genética da diversidade fenotípica, por ser uma característica de fácil visualização, permite avaliar as expressões entre os diferentes alelos e eventuais mudanças causadas por mutações. Recentemente, foram identificados diversos genes envolvidos nos processos de pigmentação. Entre eles encontram-se o gene TYR (Tiosinase) que é responsável pela produção de tiosinase e os genes MC1R(Receptor da melanocortina- 1), ASIP (Proteína de sinalização Agouti), OCA2, TYRP e DCT entre outros, que tem diferentes funções e agem em diferentes etapas dos mecanismos de pigmentação. Segundo Mundy (2005) mudanças na sequência codificante do gene receptor na melanocortina -1(MCR1) está associado com variações na coloração de pelos em mamíferos e da plumagem em aves. Esse receptor

este localizado nos melanócitos que são células especializadas na produção de melaninas.

Os melanócitos produzem dois tipos de melaninas, as eumelaninas, substâncias químicas responsáveis pelos pigmentos negro e castanho e as feomelaninas pelos os pigmentos vermelho e amarelo (Gratten et al., 2010). Contudo, o processo de determinação da coloração de pele, pelos e olhos tem início durante o desenvolvimento embrionário, quando os melanócitos formados na crista neural migram por todo o corpo do feto, até alcançarem os lugares que lhe são determinados no corpo, para isso é necessário um programa de regulação muito eficiente para garantir que as quantidades de células necessárias cheguem aos seus locais determinados. Dessa forma, os melanócitos são responsáveis pela pigmentação do corpo, se poucos desses melanócitos sobreviverem ocorreram à despigmentação, essa pode ocorrer de forma parcial ou total depende da quantidade de células sobreviventes, dando origem a fenótipos que vão de albinismos, animais brancos ou com manchas brancas.

Todo esse processo de migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência dos melanócitos são controlados por muitos genes. Os genes TYR, MITF, KIT, EDNRB, SILV, PAX3 são estudados em muitas espécies domésticas, como genes candidatos para a expressão de fenótipos brancos (Haase et al., 2013). O gene MITF (Fator de transcrição associada à microftalmia) foi apontado por Levy et al. (2006) como o principal gene responsável pelo desenvolvimento de melanócitos, função e sobrevivência através da modulação vários genes que atuam conjuntamente, em humanos. Alguns estudos realizados com espécies domésticas têm relacionado esse gene como o principal gene nesse processo (Philipp et al., 2011; García-Gámez et al., 2011).

Quando os processos de migração dessas células ocorrem adequadamente, é necessária a atividade de outros genes como MC1R para que ocorra o processo de diferenciação de pigmentos. Esse é um processo secundário, onde o hormônio estimulante dos melanócitos (α -HMS), secretado pela glândula pituitária, liga-se ao receptor da melanocortina-1(MC1R), acoplado a proteína G, faz com que desencadeie o processo de ativação da enzima Tirosinase, essa enzima oxidará o aminoácido tirosina à dopaquinona, esse sofrera ação de outras enzimas produzindo os pigmentos eumelanicos. Quando a proteína sinalizadora Agouti (ASIP), sintetizada pelo gene Agouti, se liga ao receptor MC1R, a atividade da enzima TYR é reduzida,

ocasionando a produção de pigmento feomelanina, assim os diferentes pigmentos estarão condicionados a ativação de receptores específicos (Figura 1.2).

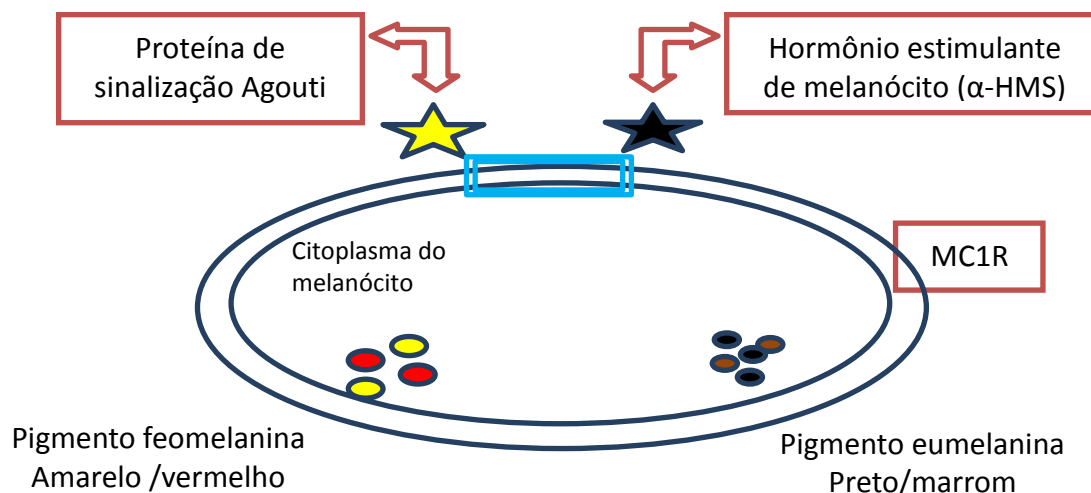


Figura 1.2 Representação simplificada da síntese de feomelanina e eumelanina nos melanócitos.

Os loci Extensão e Agouti são os principais loci que afetam a quantidade relativa de pigmentos produzidos nestas células. Estes loci apresentam interações epistáticas em diferentes espécies de mamíferos. O locus de extensão codifica o gene do receptor de melanocortina - 1 (MC1R). O alelo dominante no locus de extensão induz a pigmentação negra, enquanto que alelos recessivos estimulam a produção de pigmentos vermelhos e amarelos. As mutações no locus Agouti têm um efeito contrário, em geral, os alelos dominantes determinam fenótipos feomelânicos, enquanto que os alelos recessivos causam cor da pelagem negra com algumas exceções (Fontanesi et al., 2009). Atualmente, temos estudos o suficiente que comprovem a importância da proteína sinalizadora ASIP e do MC1R na regulação dos tipos de pelagem em ratos, no entanto, em humanos e outras espécies de mamíferos, estes mecanismos não estão totalmente esclarecidos.

Em humano o gene MC1R está localizado no cromossomo 16q24.3 desempenha um papel importante na genética da pigmentação, sendo altamente polimórfico na população branca, variantes encontradas para esses genes

foram associadas com pele clara e cabelo ruivo e ao risco de melanoma cutâneo maligno e câncer de pele não melanoma (Bastiaens et al., 2001). Estudos de associação de associação ampla do genoma (GWAS) em humanos tem confirmado a associação de vários loci com características de pigmentação, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em MC1R e ASIP, associado a variações na cor do cabelo, a sensibilidade ao sol e a presença de sardas (Dessiniot et al., 2011). De acordo com Crepaldi et al.(2003), em bovinos os mecanismos e genes que determinam a cor de pelagem são semelhantes aos mecanismos e genes que controlam essa característica em humanos, bem como em outros mamíferos.

Em caprinos uma grande parte da variabilidade na cor de pelagem tem sido explicada por um grande número de alelos do locus Agouti, já o locus de extensão parece ter um papel menor importância, porém, em alguns casos os efeitos epistáticos de alelos do locus Agouti podem confundir ou mascarar as ações do locus de extensão (Fontanesi et al., 2009).

O locus Agouti tem a principal contribuição sobre a determinação de cor de pelagem em ovinos. Esse locus tem ao menos 18 alelos que participam da distribuição dos pigmentos eumelaninas ou feomelanina (Lundie, 2004). Os genes desse locus interagem com outros genes do locus de extensão e os resultados dessas interações produzem os mais diferentes fenótipos. Segundo Vage et al. (1999), a pelagem negra dominante em ovinos pode ser causada por um alelo ED (preto dominante) no locus extensão. Norris et al. (2008) identificaram uma região com um conjunto de duplicação de 190kb, a região codificadora AH CY e a região promotora ITCH que engloba o ASIP como a causa genética da pelagem branca dominante e relataram que a pelagem negra recessiva pode ser resultado do gene ASIP cópia simples com promotor ASIP silenciados em ovinos. Royo et al.(2008) investigaram a pelagem negra recessiva em ovinos da raça Xalda, eles testaram a ação do alelo preto dominante no locus de extensão (E (D)) e uma deleção de 5 pb ((X99692:c.100_104del; A(del)) na sequência codificante do ASIP, para o padrão de pelagem negra em 188 indivíduos. O alelo E (D) não foi encontrado nas amostras, apenas, 11 indivíduos eram homocigotos para o alelo A(del)ASIP, todos os indivíduos portadores do genótipo A(del)/A(del) eram fenotipicamente negros, porém, a maioria não eram homocigotos para a deleção de 5 pb, rejeitando a hipótese do genótipo A(del)/A(del) ser a única causa da cor da pelagem negra recessivo em ovinos .Yang et al. (2013) sequenciaram a região completa do gene MC1R em ovinos chinês, com pelagem totalmente branca, marrom e negra,

eles identificaram 5 SNPS, sendo duas mutações não sinônimas (c.218 T>A, p.73 Met>Lys. c.361 G>A, p.121 Asp>Asn) e três sinônimas (c.429 C>T, p.143 Tyr>Tyr; c.600 T>G, p.200 Leu>Leu.c.735 C>T, p.245 Ile>Ile), todas as mutações foram encontradas em animais de pelagem negra, já nas raças de pelagem marrom foram encontradas duas das mutações não sinônimas, foi identificado ainda um único haplótipo AATGT exclusivo de animais com pelagem negra, sugerindo que mutações no gene MC1R são responsáveis pelo fenótipo negro em ovinos. Apesar da cor de pelagem ser uma característica morfológica, sua expressão não depende somente de fatores genéticos. As diferentes variações na cor e volume de pelagem nos mamíferos podem estar relacionados com fatores externos, variações ambientais ou com fatores internos, como fatores hormonais (Bordignon & França, 2004).

2.3 Implicações do Padrão Racial na Seleção

A seleção de acordo com os padrões raciais prioriza as características fenotípicas, sendo os animais são julgados pela aparência, considerando-se os critérios estabelecidos para a raça, independentemente de suas características produtivas.

De acordo com esse critério comumente são selecionados apenas animais tidos como elite, porém, essa classificação não inclui o mérito genético dos mesmos, e nem sempre os animais selecionados por esses critérios são viáveis reprodutivamente o que limita a quantidade e a qualidade de animais aptos para a reprodução.

Entretanto a seleção realizada com o auxílio do melhoramento genético possibilita a dispersão e a multiplicação de melhores genótipos e que conseqüentemente, produzem melhores progênes.

Em muitos casos, a taxa de descartes por características secundárias são priorizadas, como é o caso da seleção para a cor de pelagem em rebanhos ovinos da raça Morada Nova. Nestes rebanhos é frequente o aparecimento de animais de pelagem negra, entre outras características que discordam do padrão racial. De acordo com Muniz et al., (2012), 4,97% de animais dos rebanhos são descartados por terem pelagem negra. Portanto, as taxas de descartes são elevadas, considerando que

é apenas uma característica e que não tem importância do ponto de vista produtivo. A raça Morada Nova apresenta um pequeno número de criatórios, com um número reduzido de animais disponíveis, além disso, a dificuldade de se obter animais dentro do atual padrão racial pode ter desestimulado os produtores e contribuído ainda mais a diminuição do efetivo da raça (Muniz et al., 2012).

Estes descartes secundários quando reduzido, aumentam-se as taxas de reposição voluntária, desencadeando um aumento na rentabilidade da fazenda e/ou permite o uso de uma maior pressão de seleção, contribuindo para o melhoramento genético do rebanho (Van der Werf, 2006), ademais para que um programa de melhoramento genético tenha êxito, deve-se trabalhar com alta pressão de seleção, o que não é possível com um pequeno número de animais.

Outras raças de animais de produção apresentam essa variação entre os pigmentos eumelânicos e feomelânicos, como é o caso dos bovinos Aberdeen Angus. A Associação Brasileira de Angus, bem como Associação Nacional de Criadores “Herd- Book Collares” reconhece para fins de registro genealógico as duas variedades da raça, a variedade vermelha e a negra, embora, a variedade vermelha tenha sido popularizada como Red Angus. Os ovinos da raça Manchega apresentam um rebanho com 90% de animais brancos e os outros 10% é constituído de animais negros, esses são aceitos como uma variedade da raça. Portanto, são apenas variações entre os diferentes tipos de pigmentos melânicos, do ponto de vista produtivo e reprodutivo não tem diferenciação genética.

2.4 Estudos de Associação Ampla do Genoma (GWAS)

As tecnologias de nova geração também tiveram um papel fundamental, proporcionando maior agilidade e menor custo. Hoje esse tipo de tecnologia está disponível de forma terceirizada, o que diminuiu os custos com mão de obra para obtenção dos dados equipamentos (Purcell et al., 2007). Os avanços no sequenciamento e tecnologias de alto rendimento tornaram os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) uma análise prática para a associação de genes a características complexas. Essas vantagens possibilitaram também a utilização desses estudos para a melhoria trabalhos de conservação e melhoramento genético animal.

Dois plataformas, Illumina (San Diego, CA) e Affymetrix (Santa Clara, CA), foram primordiais para o início dos estudos GWA. Essas têm renovado a cada ano seus produtos, proporcionando diferentes abordagens para a identificação de variação de SNPs. A Affymetrix imprime pequenas cópias de sequências de DNA no chip como pontos que reconhecem um SNP alelo específico. Os nucleotídeos são detectados por hibridação diferencial do DNA da amostra. Já a Illumina baseada em bead (esferas) com sequências de DNA ligeiramente mais longas para detectar alelos. Os chips da Illumina proporcionam maior especificidade e por isso tem também um maior valor (Bush & Moore, 2012). Independentemente da tecnologia utilizada e do modelo genético da característica, para avaliar a variação genética é necessária uma abordagem cuidadosa para a caracterização do fenótipo de interesse e obtenção de resultados significativos.

A abordagem mais comum nesse tipo de estudos é a do tipo caso-controle em que são utilizados dois grupos, um expressando a característica pesquisada e o outro grupo que não expressa essa característica. Todos os indivíduos dos grupos são genotipados para a maioria dos SNPs conhecidos, o número de SNPs utilizados vai depender da tecnologia utilizada. Objetiva-se verificar para cada SNP se a frequência do alelo é significativamente diferente entre casos e controles. A unidade fundamental para verificar o tamanho do efeito é a razão de probabilidade (odds ratio). A razão de probabilidade relata a relação entre duas proporções. Assim, quando a frequência de um determinado alelo é maior nos grupos de casos que nos controles, razão de probabilidade será maior que um. O mesmo é usado para o alelo de menor frequência. O objetivo de GWAS é encontrar o valor de odds ratio significativamente diferente de 1. Isso indica que um determinado SNPs está relacionados com a característica investigada. Geralmente é utilizado o software de bioinformática para as análises como, por exemplo, o Plink (Clarke et al., 2011).

Na produção animal os estudos de GWA são recentes. Apesar disso, vários resultados já foram conseguidos, principalmente, para características quantitativas. Esses estudos têm sido utilizados para acelerar os processos de melhoramento genético de características de interesse econômico (Fan et al., 2011). Esses têm sido utilizados para investigação de características relacionadas à produção de leite, teor de gordura intramuscular, fertilidade e crescimento. Muitos loci e SNPs têm sido identificados para essas e outras características em bovinos, suínos, entre outras espécies de produção.

Para ovinos, um dos primeiros estudos de GWA foi realizado por Jonhstonn et al. (2011). Eles investigaram variações na morfologia dos chifres em ovelhas Soay e encontraram SNPs possivelmente associados a variantes próximas ao gene RXFP2. Kijas et al. (2013) investigaram o caráter negro dominante em ovinos da raça Manchega. Eles conseguiram identificar um SNPs altamente significativo próximo ao gene MC1R. Li et al. (2014) realizaram um estudo de GWA para identificar SNPs no gene ASIP associado com pelagem branca e não branca em ovinos da raça Finn da Finlândia. Eles encontraram 35 SNPs associados com as cores estudadas. Esses SNPs cobrem regiões genômicas que englobam três genes associados a padrões de pigmentação (TYRP1, ASIP e MITF) em ovinos.

**CAPÍTULO 2- ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA PARA
COLORAÇÃO DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA**

RESUMO

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA PARA COLORAÇÃO DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA MORADA NOVA. Maria Malane Magalhães Muniz¹. Samuel Rezende de Paiva².

1 – Mestranda na UnB, Brasília/DF

2 – Pesquisador Embrapa Labex EUA – Secretaria Relações Internacionais

A Associação brasileira dos criadores de ovinos (ARCO) reconhece duas variedades da raça Morada Nova, a branca e a vermelha. Entretanto, existe uma variedade negra que vem sendo frequentemente eliminada dos rebanhos por ser desclassificada para fins de registro genealógico. Estudos anteriores da equipe sugerem que esta variedade é muito similar a variedade vermelha. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise de GWAS (Genome-wide association study) para identificação de regiões genômicas relacionados à coloração de pelagem e para confirmar o posicionamento da variedade negra em relação às demais variedades de ovinos dessa raça. Foram analisados 61 animais (branco= 20; negra= 20; vermelha= 21), genotipados para OvineSNP50kBeadChip, contendo 54.241 marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism). No controle de qualidade, excluí-se amostras com call rate < 80 %; amostras outliers, quanto as taxas heterozigosidade autossômica, foi calculado as faixas de 1,5 interquartis (IQR); excluí-se amostras idênticas ou animais com mais de 50% de semelhança (IBD; PCA e Fst); SNPs sem posições definidas nos cromossomos; marcadores monomórficos; SNPs com Call rate < 90 %; Frequência do menor alelo(MAF) <0,0001 e os cromossomos sexuais. Analisou-se a associação para diferenciação de pelagem entre a variedade negra das pelagens vermelha e branca, bem como a diferenciação entre animais negros e vermelhos. Após o controle de qualidade obteve-se um conjunto de dados de 45. 982 SNPs e 48 amostras, (negra= 18; brancas= 13; vermelha= 17). Para GWAS utilizou-se o modelo dominante, teste qui-quadrado corrigido para o controle genômico. O SNPs mais significativo nos GWAS foi o s26449.1, esse SNP encontra-se a uma distância de 163.5 kb do gene MC1R. Esse gene parece ter papel fundamento no processo de diferenciação de pelagem da variedade negra das demais pelagens para raça Morada Nova.

Palavras - Chave: *Ovis aries*, recursos genéticos animais, pigmentação de pelagem, MC1R

ABSTRACT**GENOME WIDE ASSOCIATION FOR PIGMENTATION IN SHEEP MORADA NOVA.** Maria Malane Magalhães Muniz. Samuel Rezende de Paiva (Orientador).

The Brazilian Association of sheep creators (ARCO) acknowledge two varieties for the Morada Nova, white and red. However, the black variety is often eliminated flocks to be disqualified for genealogical record purposes. In previous team study suggests that this variety is very similar to red variety. Thus, the aim of this study was to conduct an analysis of GWAS (Genome-wide association study) to identify genomic regions related to coat color and to confirm the position of the black variety compared to other varieties of sheep that breed. Were used 61 animals (white = 20; black = 20; red = 21), genotyped for OvineSNP50kBeadChip containing 54,241 markers of type SNP (Single Nucleotide Polymorphism). In quality control, is excluded samples with call rate <80%; outliers samples, as autosomal heterozygosity rates, we calculated the 1.5 interquartile ranges (IQR); excludes identical samples or animals over 50% similarity (IBD; PCA and Fst); SNPs without defined positions on chromosomes; monomorphic markers; SNPs with call rate <90%; deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) <0.0001 and the sex chromosomes. We analyzed the association to coat differentiation between the red and black varieties and differentiation between white and non-white animals. After quality control obtained a set of data 45982 SNPs and 48 samples (black = 18, white= 13, red = 17). For GWAS used the dominant model, chi-square test corrected for genomic control. The SNP most significant in GWAS was the s26449.1, this SNP is located at a distance of 163.5 kb MC1R gene. This gene seems to have ground coat role in differentiation process of the black variety of other coats for Morada Nova.

Keywords: *Ovis aries*, animal genetic resources, coat pigmentation, MC1R.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um rebanho ovino com mais de 17 milhões de animais e mais de 60% são classificados como deslanados (IBGE, 2013) com maior distribuição na região Nordeste (Hermuche et al., 2013). A raça deslanada Morada Nova (Figure 2.1) é um dos principais grupos genéticos de ovinos localmente adaptados do Brasil, onde tem sido explorada mais para corte e apresenta prolificidade e habilidade materna relativamente elevadas (Facó, 2008). Atualmente, a Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos (ARCO) reconhece duas variedades para a raça, vermelha e branca (ARCO, 2014) e animais negros são rotineiramente eliminados dos rebanhos.

Em 2007, foi criado programa de melhoramento genético participativo da Raça Morada Nova, coordenado pela Embrapa Caprinos e Ovinos e o com a participação da Associação de criadores da raça bem como Universidades e outras Unidades da Embrapa (Shiotisuki & Facó, 2013). Estes programas são formas alternativas de conservação e uso de raças localmente adaptadas e que tem como objetivo principal aplicar e integrar os conhecimentos populares, técnicos e acadêmicos em prol do desenvolvimento socioeconômico de comunidades regionais (Mirkana et al., 2012).

Um dos desafios atuais do Programa é a eliminação anual de um grande número de animais que não apresentam todas as características fenotípicas exigidas para concessão de registro genealógico pela ARCO. Por exemplo, estima-se que cor da pelagem e pigmentação do espelho nasal sejam responsáveis por até 45% dos animais descartados anualmente (Muniz et al., 2012; Facó, 2015, personal communication). Estas práticas contribuem para reduzir tanto a variabilidade genética da raça bem como as chances de melhoramento de características produtivas, visto que os animais restantes suprem apenas as taxas de reposição dos rebanhos.

O emprego de chips contendo milhares de marcadores moleculares SNP (Single Nucleotide Polymorphism) em animais de produção tem otimizado a identificação de genes/ regiões relacionados a características fenotípicas, especialmente aquelas controladas por um ou poucos genes (e.g., JONHSTONN et al. 2011; KIJAS et al. 2013). Visando dar suporte ao Programa de melhoramento participativo de ovinos da raça Morada Nova, este estudo teve como objetivo realizar tanto um estudo de associação ampla do genoma (GWAS) para a coloração de pelagem na raça Morada Nova bem como quantificar a diferenciação genética entre animais de diferentes pelagens.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram utilizados animais das duas variedades de pelagem da raça, vermelha e branca, bem como animais de pelagem negra, mas que apresentavam todos os demais requisitos fenotípicos da raça (Figura 2.1) do Núcleo de Melhoramento Genético Participativo de ovinos da raça Morada Nova e amostras DNA de pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Tabela 2.1).



Figura 2. 1 Ovinos Morada Nova. (a) variedade vermelha; (b) variedade negra; (c) variedade branca. Fotos: cedidas por Débora Andrea Evangelista Façanha.

Tabela 2. 1 Amostras coletadas em diferentes fazendas, Estado e variedade de pelagem.

Fazenda	Localidade/Estado	Total	Selecionados
Variedade Negra			
A	Rio Grande do Norte	14	8
B	Rio Grande do Norte	7	5
C	Ceará	2	2
D	Paraíba	8	5
SubTotal		31	20
Variedade Vermelha			
E	Ceará	48	4
F	Ceará	30	4
G	Ceará	40	5
H	Ceará	40	5
C	Ceará	41	3
SubTotal		199	21
Variedade Branca			
I	Ceará	13	7
J	Ceará	8	6
D	Paraíba	20	7
SubTotal		41	20
Total		271	61

Foram selecionadas 61 amostras, sendo 20 animais do grupo genético negro, 20 da variedade branca e 21 da variedade vermelha. O principal critério de amostragem considerado foi à tentativa de usar um número similar de animais entre os grupos. Dentro de cada grupo os critérios adotados foram o número total de fazendas e também a quantidade e qualidade do DNA.

2.2 Coleta, processamento e Armazenamento

O sangue foi coletado por meio de punção venosa na jugular de cada animal e armazenado em tubos contendo EDTA. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração até o processamento para separação de linfócitos. O processo de separação e armazenamento consistiu em centrifugar a 3000 rpm/10 minutos e em seguida foi removido plasma sanguíneo. Posteriormente, adicionou-se soro fisiológico nos tubos com as amostras e centrifugou-se a 3000 rpm /10 minutos. Esse procedimento foi repetido por três vezes, em seguida, a camada de linfócitos foi

removida com uma pipeta de Pasteur e depositada em microtubos de 1,5 ml. Os tubos foram identificados e acondicionados em freezer a -20°C até a extração de DNA.

2.3 Extração e Quantificação de DNA

O DNA foi extraído a partir de linfócitos por meio do protocolo inorgânico modificado (Miller et al., 1988). Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND1000®) com a finalidade de verificar a quantidade e a qualidade do DNA. O material foi estocado a -20°C até o momento de sua diluição e envio para genotipagem.

2.4 Genotipagem

Alíquotas de aproximadamente 300ng de cada amostra foram desidratadas em temperatura ambiente e encaminhadas em placas de 96 poços para a genotipagem. Foram genotipadas 64 amostras utilizando o OvineSNP50 BeadChip que contém 54.241 sondas uniformemente espalhadas que identificam os marcadores SNPs. Esse Chip tem uma cobertura uniforme do genoma com uma estimativa média de um marcador a cada 46 kb (Illumina Inc., San Diego, Califórnia). A genotipagem foi realizada pela Empresa Neogen GenSeek (Nebraska EUA) e os genótipos foram analisados no Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

2.5 Controles de Qualidade da Genotipagem

O controle de qualidade das amostras e genótipos foi realizado a partir do pacote SVS do Software Golden Helix.

Controle de qualidade das amostras: As amostras foram filtradas por até três valores de eficiência de genotipagem (Call rate), de forma que foram removidas amostras com valores de call rate menores que 70%, 80% e 90%. Adicionalmente, utilizou-se a taxa

global de heterozigosidade autossômica para identificar indivíduos com sub ou sobre abundância de SNPs heterozigotos nos cromossomos autossômicos. Para determinar os outliers com sobre e sub-abundância de heterozigosidade, foram calculado as faixas de 1,5 interquartis (IQR).

Controle de qualidade dos SNPs: Foram removidos os SNPs sem posições definidas nos cromossomos; os SNPs dos cromossomos sexuais devido ao pequeno número de SNPs mapeado para esse cromossomo; marcadores monomórficos; SNPs com eficiência de genotipagem (Call rate) < 90 %; SNPs com Frequência do alelo menor (MAF) < 0,0001.

2.6 Análise da Estrutura Populacional

O parentesco entre os indivíduos foi testado por meio de uma análise IBD (Identidade por descendência), ferramenta disponível no software Golden Helix(Golden Helix, Inc.). Na análise os indivíduos foram relacionados em pares e foi testada a possibilidade de ocorrência de animais idênticos ou com um grau de semelhança superior 50%. A planilha de relacionamento entre os indivíduos foi utilizada para produzir um mapa de calor (Heatmap).

Para o teste de existência de diferenciação genética significativa entre as variedades da raça Morada Nova foram utilizadas as estimativas de *Fst* (índice de fixação). A estatística utilizada pelo software Golden Helix(Golden Helix, Inc.) para os cálculos de *Fst* é baseada na estatística de *F* descrita primeiramente por Wright (1978). Esse considera que $Fst < 0.05$ indica pouca diferenciação genética, enquanto que $Fst > 0.25$ corresponde a uma elevada diferenciação genética.

Na análise de PCA (análise dos componentes principais) utilizou-se o programa "EIGENSTRAT" que implementa esta técnica (Price et al., 2006)

2.7 Análise de Associação Genômica

Para a análise de associação genômica utilizou-se um estudo de caso-controle. O esquema de codificação “caso versus controle” os animais “caso”

receberam codificação binária 1 e os “controles” 0, de acordo com a associação dentre diferentes pelagens. Utilizou-se o modelo dominante considerando as informações genótípicas e fenotípicas. Foi aplicado ao modelo o teste estatístico de qui-quadrado onde foi utilizado o ajuste de Bonferroni para correção de múltiplos testes. E controle genômico (CG) para a correção de possível estratificação, considerando o fator de inflação (Lambda), λ .

Para as associações foram realizados os seguintes contrastes de pelagens: 1) animais negros (casos) versus animais vermelhos + brancos (controles); 2) animais negros (casos) versus animais vermelhos (controles). Os resultados das associações foram expressos no gráfico de Manhattan plot.

Para a identificação das regiões genômicas e genes utilizou-se a versão Oar_v3. 1 do genoma ovino, disponível no banco de dados genômicos Ensembl, através da ferramenta Genome Browse disponível no software Golden Helix (Golden Helix, Inc.), foi possível a visualização das associações em escala genômica.

2.8 Sequenciamento de fragmentos do gene MC1R

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizando 0,5 μ M de primer, descritos por Vage et al., (1999), 1,0mM dNTP, 5,0mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase 3,0 η g de DNA e tampão 1X (Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl) em um volume final de 20 μ L. Utilizou-se termociclador Veriti® Thermal Cyclers - Life Technologies. A amplificação ocorreu a 95°C por 5 minutos, 36 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto. Realizou-se o anelamento dos primers em 1 minuto, a extensão por 1 minuto e 30 segundos à 72°C, e uma extensão final dos produtos a 72°C por 4 minutos.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Controle de Qualidade

Foram enviadas para a genotipagem 61 amostras e apenas três foram descartadas. Das amostras que falharam duas eram de animais de variedade vermelha (Fazenda G, Ceará) e uma da pelagem negra (Fazenda A, Rio Grande do Norte). Para controle de qualidade das amostras (Tabela 2. 2), optou-se por eliminar amostras *call rate* < 80%, pois entre as taxas de eficiência de genotipagem testadas (70%, 80% e 90%), essa foi a que mais contribuiu para a menor eliminação de SNPs no controle de qualidade dos marcadores, conciliado a menor eliminação de amostras e melhor qualidade dos dados. Após o corte dessas amostras a taxa de eficiência de genotipagem (*call rate*) média foi de 98%.

Tabela 2. 2 Números de amostras excluídas pelo controle de qualidade das amostras para as variedades de pelagem de ovinos da raça Morada Nova

Critérios	Negros	Branco	Vermelhos	Total
Total inicial de amostras	20	20	21	61
Falha de genotipagem	1	0	2	58
Eficiência de genotipagem (<i>call rate</i>)	0	7	2	49
Heterozigosidade nos autossomos	0	0	0	49
Amostras idênticas ou com parentesco > 50%	1	0	0	48
Total após filtro	18	13	17	48

No controle de qualidade para marcadores foram eliminados de análises posteriores todos os SNPs que tiveram foram dos critérios estabelecidos. Os

resultados desses controles estão descritos na Tabela 2. 3. Após a remoção desses SNPs observou-se que a média de eficiência de genotipagem para SNPs foi de 98 %.

Tabela 2. 3 Número de SNPs eliminados pelos os controles de qualidade dos marcadores

Critérios	Número de SNPs eliminados	Total
Total inicial		54.241
SNPs sem posições específicas cromossomos	379	53.862
SNPs do cromossomo X	1.449	52.413
Demais filtros (Call rate < 0,90; SNPs monomórficos; MAF ¹ < 0.0001)	6.431	46.663
Total de SNPs	8.259	45.982

¹MAF: Frequência do alelo menor

3.1.2 Análise da Estrutura Populacional

As análises dos valores de IBD e componentes principais permitiram identificar dois animais duplicados (Figura 2.2). Dessa forma, eliminou-se uma das amostras duplicadas. Após a eliminação dessa amostra realizou-se novamente a análise para certificar-se da correta eliminação de amostras problemáticas (Figura 2.2). Não identificaram animais com parentesco superior a 50% (Figura 2.3).

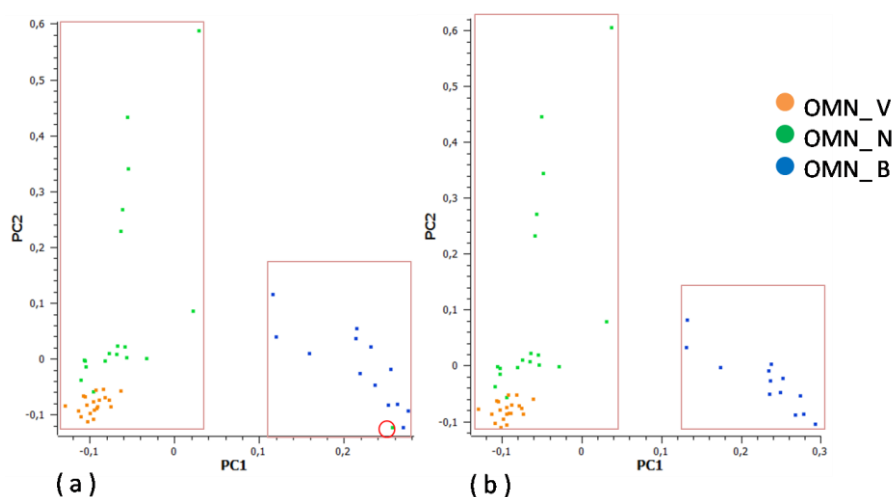


Figura 2.2 Representação Dimensional da análise de componentes principais de três variedades de ovelhas da raça Morada Nova. (a) Análises para a identificação de amostras inconsistentes quanto à estratificação de população. A amostra duplicada foi identificada com círculo vermelho. (b) Análise de componentes principais após a remoção de amostras inconsistentes quanto à estratificação de população. MN_B= variedade branca, MN_V= variedade vermelha, MN_N= variedade negra.

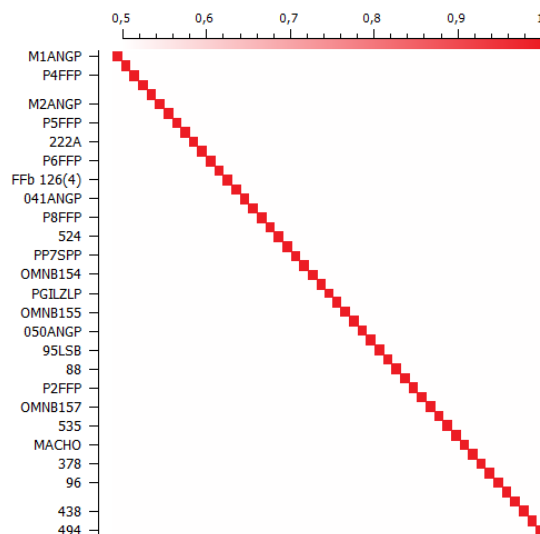


Figura 2.3 Heatmap mostra a proporção de alelos comuns entre os indivíduos. Não foi observado indivíduos com mais de 50% de alelos compartilhados.

O F_{st} para a diferenciação genética entre as pelagens branca e vermelha foi de 11% enquanto que para as pelagens vermelha e negra foi de apenas 2% (Tabela 2.5). Segundo Wright (1978), o $F_{st} < 0.05$ indica pouca diferenciação genética, enquanto que $F_{st} > 0.25$ corresponde a uma elevada diferenciação genética e os valores entre 0.05 e 0.25 apontam um processo de diferenciação. Portanto, observou-se um processo de diferenciação entre a variedade branca e as demais pelagens, supondo a formação de dois grupos distintos um formado por animais brancos e o outro formado por animais negros e vermelhos.

Tabela 2.4 Índice de fixação (F_{st}) entre as diferentes variedades de ovinos da raça Morada Nova

Pelagem	Branca	Negra	Vermelha
Branca	0	0.09	0.11
Negra	0.09	0	0.02
Vermelha	0.11	0.02	0

3.1.3 Análises de Associação Genômica

Foram realizados dois estudos, o primeiro utilizou GWAS para contrastar animais de pelagem negra (caso) versus o grupo de animais de pelagens brancas e vermelha (controle), buscando encontrar possíveis regiões genômicas responsáveis pela diferenciação entre as diferentes cores de pelagens. No segundo estudo, foram associados os animais de pelagens negros e vermelhos, principalmente em razão do baixo valor de F_{st} encontrado entre essas duas pelagens.

O teste de associação entre os negros (caso, $n=18$) versus os animais vermelhos e brancos (controle, $n=30$) (Figura 2. 4) elencou 10 SNPs com alto grau de significância (Tabela 2.6 e Figura 2.4). Os limiares para o valor-P foram estabelecidos empiricamente com base na representação visual dos SNPs com maior destaque no gráfico de Manhattan plot bem como a literatura descrita por Kijas et al. (2013) onde foram selecionados os 10 SNPs mais significativos. O valor-P do décimo SNPs no presente estudo foi de $1,06 \times 10^{-06}$. Li et al.(2014) adotaram empiricamente o valor- P de $2,11 \times 10^{-07}$. Portanto, optamos por escolher os 10 SNPs mais significativos (valor-P < $1,04 \times 10^{-06}$). A maioria dos SNPs associados com a variação da cor de pelagem entre animais negros versus vermelhos e brancos estão compreendidos em uma janela de 6.8Mb do cromossomo 14.

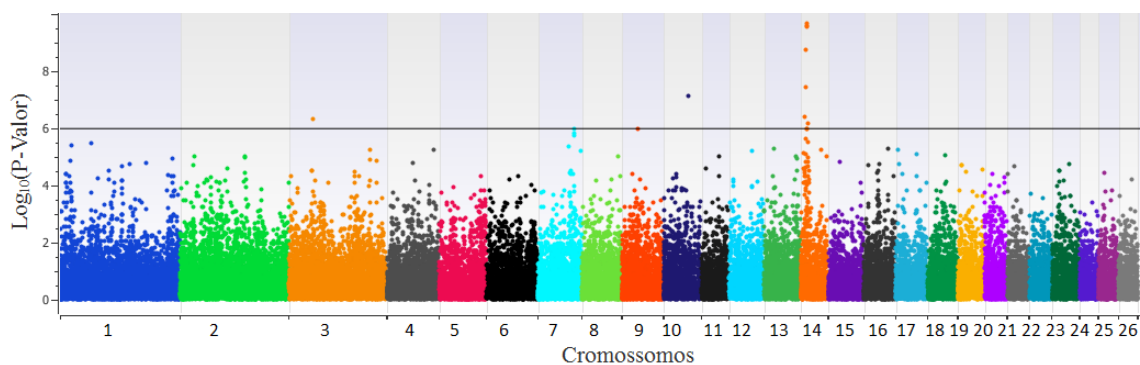


Figura 2. 4 Manhattan plot para estudo de associação entre as pelagem negro versus animais vermelho e branco, considerando estudo de caso/controle, respectivamente. Os SNPs foram distribuídos ao longo de cada cromossomo em diferentes cores. Para corrigir possível estruturação de população o P- valor foi ajustado para o método de controle genômico implementado do software Golden Helix (Golden Helix, inc.). O maior número de SNPs significativos foi plotado no cromossomo 14, sendo o SNP s26449.1 o mais significativo para essa análise.

Tabela 2.5 Estudo de associação genômica para cor de pelagem negra (caso) versus pelagem branca e vermelha (controle) em ovinos Morada nova

Marcadores	Cromossomos	Posições ²	P- Valor	Menor Alelo	MAF ¹	Genes Próximos	Distância do SNP	Características Relacionadas
s26449.1	14	14396052	2,16e ⁻⁰¹⁰	A	0.37	MC1R	163.5 kb	
s50332.1	14	13311886	2,54e ⁻⁰¹⁰	T	0.27	MC1R	919.4 kb	
OAR14_14650208.1	14	14650208	2,75e ⁻⁰¹⁰	T	0.46	MC1R	418.7 kb	Pigmentação (Kijas, et al., 2013); (Vage et al., 1999).
s72056.1	14	12234787	1,74e ⁻⁰⁰⁹	G	0.27	MC1R	2 Mb	
s56356.1	14	12018702	3,71e ⁻⁰⁰⁸	G	0.25	MC1R	2,2 Mb	
OAR10_55949918.1	10	55949918	7,58e ⁻⁰⁰⁸	A	0.20	SPRY – 2	127.6 kb	Participa da miogênese (Laziz, et al., 2007)
s11567.1	14	9137865	4,20e ⁻⁰⁰⁷	C	0.21	CDH13	Intron 3	Melanoma (Bossert et al., 2014)
OAR3_56021384.1	3	56021384	4,96e ⁻⁰⁰⁷	C	0.26	-	-	-
OAR14_15968361.1	14	15968361	7,04e ⁻⁰⁰⁷	G	0.46	MC1R	1.7 Mb	Pigmentação (Kijas, et al., 2013)
OAR7_82985623.1	7	82985623	1,04e ⁻⁰⁰⁶	T	0.33	YLPM1	Intron 20	Apoptose (Núñez et al., 2015)

Foram indicados os 10 SNPs mais significativos para a análise associação entre a pigmentação de pelagem negra versus pelagens não- negra (vermelha e branca) em seus respectivos cromossomos e suas posições em pares de base. A frequência do menor alelo foi dada para a população. O valor do qui-quadrado correspondente ao teste de associação foi fornecido em P-valor e -log10 (p-valor) na figura 2.4. Seguidos dos genes que estiveram nas proximidades desses SNPs, sua distância e as características relacionadas com esses genes. ¹ Frequência do alelo menor

O segundo estudo realizado verificou a variação de pelagem entre os animais negros e vermelhos, estudo de caso versus controle, respectivamente. Dessa forma, a análise foi composta por 18 casos e 17 controles. Os resultados dessa associação identificaram 10 SNPs significativos com um limiar do valor P de $6,39 \times 10^{-6}$ (Figura 2.5 e Tabela 2.6).

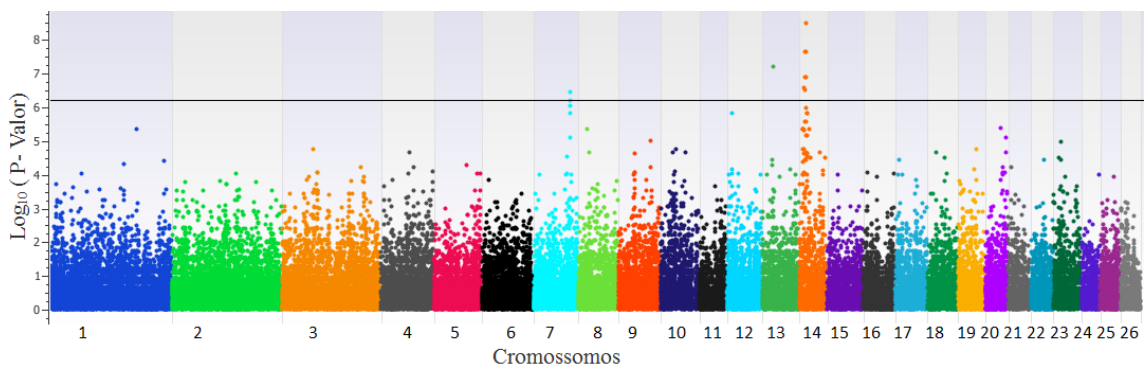


Figura 2.5 Manhattan plot para estudo de associação entre as pelagens negro versus animais vermelho, considerando estudo de caso/controle, respectivamente. Os SNPs foram distribuídos ao longo de cada cromossomo em diferentes cores. Para corrigir possível estruturação de população o P-valor foi ajustado para o método de controle genômico implementado do software Golden Helix (Golden Helix, inc.). O maior número de SNPs mais significativos foi plotado no cromossomo 14, sendo o SNP s26449.1 para essa análise.

A maioria dos SNPs associados com a variação da cor de pelagem entre animais negros versus vermelhos estão compreendidos em uma janela de 4.0 Mb do cromossomo 14. Dentro dessa região encontra-se o gene MC1R, abrangendo uma janela de 1.18 kb da posição (14231363bp a 14232541bp), portanto, a maioria dos SNPs significativos margearam esse gene, que tem sido altamente relacionado a pelagem negra dominante em ovinos e em outros mamíferos.

Para as duas análises o SNPs o mais significativo foi o s26449.1. Este está localizado na posição 14396052 bp no cromossomo 14. Esse SNP foi apontado por Kijas et al. (2013) como o SNP mais significativo em estudo de associação ampla do genoma para a diferenciação entre pelagens negros e não negra em ovinos da raça Manchega. Os resultados encontrados por eles foram utilizados para confirmar a confiabilidade dos GWAS para características que tem caráter dominante, utilizando um pequeno número de amostras, considerado que eles já conheciam os genótipos dos animais utilizados. Nesse estudo eles conseguiram encontrar apenas dois SNPs significativos no cromossomo 14. Ao contrário do

observado nesse estudo, onde observou se (tabela 2.5 e tabela 2.6) que 70% dos SNPs significativos foram encontrados no cromossomo 14 para as duas análises. Portanto, parece que os mecanismos que regulam a diferenciação de pelagem em ovinos da raça Morada Nova têm um comportamento semelhante ao encontrado em outras raças de ovinos que apresentam um caráter dominante para a pelagem negra.

Tabela 2.6 Estudo de associação genômica para cor de pelagem negra (caso) versus pelagens vermelha (controle) em ovinos Morada nova

Marcadores	Cromossomos	Posições	P- Valor	Menor Alelo	MAF ¹	Genes Próximos	Distância do SNP	Características Relacionadas
s26449.1	14	14396052	3,30 e ⁻⁰⁰⁹	A	0.48	MC1R	163.5 kb	Pigmentação (Kijas, et al., 2013); (Vage et al., 1999);
s72056.1	14	12234787	2,30 e ⁻⁰⁰⁸	G	0.34	MC1R	2 Mb	
OAR14_14650208.1	14	14650208	2,30 e ⁻⁰⁰⁸	T	0.41	MC1R	418.7kb	Pigmentação (Li et al., 2014)
s15466.1	13	23798486	6,47 e ⁻⁰⁰⁸	T	0.25	-	-	
s50332.1	14	13311886	1,32 e ⁻⁰⁰⁷	T	0.37	MC1R	919.4 kb	
OAR14_15813627.1	14	15813627	1,32 e ⁻⁰⁰⁷	G	0.41	MC1R	1,6 Mb	Pigmentação (Kijas, et al., 2013); (Vage et al., 1999);
s47682.1	14	11817134	2,68 e ⁻⁰⁰⁷	A	0.36	MC1R	2.4 Mb	
s56356.1	14	12018702	3,15E e ⁻⁰⁰⁷	G	0.33	MC1R	2.2 Mb	Pigmentação (Li et al., 2014)
OAR7_82644472.1	7	82644472	3,63 e ⁻⁰⁰⁶	C	0.34	-	-	
OAR7_82590299.1	7	82590299	6,39 e ⁻⁰⁰⁶	A	0.37	-	-	

Foram indicados os 10 SNPs mais significativos para a análise associação entre a pigmentação de pelagem negra versus pelagens não-negra (vermelha e branca) em seus respectivos cromossomos e suas posições em pares de base. A frequência do menor alelo foi dada para a população. O valor do qui-quadrado correspondente ao teste de associação foi fornecido em P-valor e $-\log_{10}$ (p-valor) na figura 2.5.

Seguidos dos genes que estiveram nas proximidades desses SNPs, sua distância e as características relacionadas com esses genes.

¹Frequência do alelo menor.

3.1.4 Sequenciamento de fragmentos de MC1R

Determinou-se a sequência de codificação de um fragmento de 954pb do gene MC1R para todos os animais utilizados no GWAS. Confirma-se a identidade da sequência BLAST utilizando (GenBank n. de acesso Y13965). Observou-se que todos os animais de pelagem vermelha e branca apresentaram o alelo de tipo selvagem para as posições 73 (M73K) e posição 121 (D121N), expressando genótipo (E+). Enquanto que os animais negros apresentaram cinco diferentes genótipos, ao contrário, dos animais de pelagem vermelha e branca, estes apresentaram mutação em pelo menos uma posição, ou seja, uma mutação de substituição Met -> Lys na posição 73 (M73K) e uma Asp -> Asn na posição 121 (D121N). Portanto, fez-se necessário apenas uma cópia do alelo ED para que os animais apresentassem o fenótipo negro, confirmando a atuação do gene MC1R na expressão de fenótipos negros na raça Morada Nova.

Tabela 2.7 Distribuição e frequência dos alelos recessivo (E+) e dominante (ED) do gene MC1R

Fenótipo	Genótipo	Posição 218	Posição 429	Frequência (%)
Vermelho	E+ E+	T	C	100
Branco	E+ E+	T	C	100
	ED ED	A	T	40
	ED/E+ ED	W	T	40
Negro	E+ ED	T	T	6,7
	ED/ E+ ED/ E+	W	Y	6,7
	E+ ED/ E+	T	Y	6,7

3.2 DISCUSSÃO

As medidas de controle de qualidade adotadas na Tabela 2.3 visam à maior integridade dos dados que serão utilizados nos estudos de associação e assim diminuir as chances de associações falso-positivas. Essas estão diretamente ligadas à qualidade do DNA que pode ser afetados por muitos fatores, entre eles, o tempo de armazenamento do DNA, o método de extração, o tipo de material biológico, além de reagentes e ferramentas utilizadas da genotipagem (Laurie et al., 2010). Os parâmetros utilizados nesse estudo para a eliminação de amostras e SNPs estão de acordo com dados da literatura (Ren et al., 2011; Zhang et al., 2013).

Na primeira análise de associação realizada contrastou a variedade negra versus não- negra (vermelhos e brancos), visando identificar fatores genéticos que atuam para a diferenciação fenotípica nessa raça. Identificou-se uma região no cromossomo 14 com 7 SNPs (s26449.1; s50332.1; OAR14_14650208.1; s72056. 1; s56356.1; s11567; OAR_15968361.1) dos 10 SNPs mais significativos nessa análise, ambos relativamente próximos ao gene MC1R. Vários estudos têm sido realizados para investigar os padrões de variação na cor de pelagem de ovinos de raças comerciais e tipos selvagens, todos esses estudos têm apontado o MC1R como um dos genes responsável pelos fenótipos negros em ovinos, principalmente quando cor negra parece ter padrão de herança dominante (Vage et. al., 1999; Deng et al., 2009; Fontanesi et al., 2010).

Esse gene foi bem caracterizado como responsável pela produção de melanina e diferenciação entre os pigmentos eumelânicos e feomelânicos em mamíferos, pigmentos estes que são responsáveis pelas distinções entre as pelagens negras e marrons das pelagens amarelas e vermelhas (Grantten et al., 2012). Portanto, considerando os resultados encontrados nos GWAS e sequenciamento de fragmentos do MC1R, aponta-se esse gene como um possível responsável pela expressão de fenótipos

negros em ovinos da raça Morada Nova. Estudos têm relatado que a região codificadora do MC1R é altamente conservada em várias espécies de mamíferos (Yang et al., 2013; Deng et al., 2009), além disso, os resultados obtidos concordam com resultados de Vage et al. (1999) onde caracterizam o alelo dominante do gene MC1R como responsável pela cor de pelagem negra em ovinos da raça Dala norueguês.

Considerando os resultados desse estudo e os conhecimentos relacionados em outros estudos para esta característica, infere-se que, como ocorre em outras raças de ovinos, para a raça Morada Nova o MC1R seja o principal responsável pelo fenótipo negro e suas variações (vermelho, marrom, etc). Dessa forma, as diferenças entre as cores de pelagem negra e vermelha são resultado da expressão de diferentes alelos de um mesmo gene. Essas duas variedades não apresentam variação genética ao ponto de serem destacados em grupos diferentes.

Essa variação entre as pelagens negras e vermelhas é encontrada em outras raças de ovinos e bovinos e essas são entendidas pelas associações de registro genealógico como variação fenotípica dentro da raça. Como é o caso dos bovinos Aberdeen Angus. A Associação Brasileira de Angus, bem como Associação Nacional de Criadores “Herd- Book Collares” reconhece para fins de registro genealógico as duas variedades da raça, a variedade vermelha e a negra, embora, a variedade vermelha tenha sido popularizada como Red Angus. Os ovinos da raça Manchega apresentam um rebanho com 90% de animais brancos e os outros 10% é constituído de animais negros, esses são aceitos como uma variedade da raça. Portanto, são apenas variações entre os diferentes tipos de pigmentos melânicos e que não tem diferenciação do ponto de vista produtivo (Kijas et al., 2013).

Os descartes de animais negros têm reduzido a variabilidade genética da raça Morada Nova, esses animais poderiam estar agregando um número maior de alelos ao pool gênico disponíveis para a seleção de características produtivas e reprodutivas para a raça. E futuramente, esses animais poderiam ser provados quanto à eficiência produtiva e reprodutiva, o que não tem sido possível devido aos descartes por desclassificação para registro genealógico.

A inclusão desses animais no programa de conservação e melhoramento genéticos, bem como o reconhecimento dessa variedade pelas associações de criadores contribuiria para a maior disponibilidade de animais para seleção de características produtivas e aumento na variabilidade genética do rebanho, considerando que nascem entre 4,97% (Muniz et al., 2012) de animais negros nos

rebanhos do Núcleo de Conservação da raça. Esse número a mais de animais disponíveis nos rebanhos possibilitaria o uso de uma maior pressão de seleção para características produtivas e reprodutivas.

4. CONCLUSÕES

O gene MC1R parece ser o principal gene no processo de diferenciação de pelagem entre as variedades vermelha e negra em ovinos da raça Morada Nova. Esse estudo permitiu conhecer um pouco mais da variação da cor de pelagem em ovinos dessa raça, além de contribuir para o maior esclarecimento dos padrões de variação de pigmentação em ovinos em geral.

Difícilmente será atendido plenamente o padrão racial estabelecidos para a pigmentação de pelos e pele para a raça, considerando que essa característica apresenta fatores genéticos favoráveis a expressões fenotípicas contrárias as priorizadas no padrão racial.

Os resultados encontrados nesse estudo acrescem argumentos para a discussão, do quão é importante a conciliação entre conservação, padrões raciais e melhoramento genético. E assim, fazer uma reavaliação dos padrões raciais estabelecidos para a raça Morada Nova para que se permita a utilização de seleção para características com peso econômico e não apenas características raciais.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. CONCLUSÕES E DIRECIONAMENTO FUTUROS

As novas tecnologias de genotipagem de marcadores SNPs a partir de microarranjos permitiram um grande avanço nos estudos de associação ampla do genoma (GWAS) e, conseqüentemente, contribuíram para o aumento da compreensão da relação entre o genoma de ovinos e seus fenótipos. As várias metodologias desenvolvidas para lidar com o enorme volume de dados genotípicos foram eficientes na identificação de SNP em regiões do genoma que desempenham papel no processo de determinação da coloração de pelagem em ovinos da raça Morada Nova.

Os resultados encontrados nesse estudo acrescem argumentos para a discussão, do quão é importante a conciliação entre conservação, padrões raciais e melhoramento genético. Até que ponto esses padrões podem ser estabelecidos para raça historicamente recentes, principalmente, para raças que surgiram sem a interferência direta do homem na sua formação e para as quais pouco se sabe do ponto de vista genético. E a partir disso, avaliar o quanto essas questões implicam na utilização desses animais e restringem a maior representatividade dessas raças no cenário da ovinocultura. Tem em vista, atual situação do rebanho de ovinos da raça Morada Nova, que apesar de sua importância, vem sofrendo estagnação do ponto de vista produtivo, devido às divergências entre padrões raciais. Padrões esses que devem ser reavaliados frente, aos resultados conseguidos nesse e outros estudos que constaram a não diferenciação de grupos entre as variedades vermelha e negra, portanto, a variedade negra é um subgrupo dentro da variedade vermelha que deverá ser inclusa no programa de melhoramento genético da raça, contribuindo para o aumento da variabilidade genética e disponibilidade de animais para a seleção de características produtivas e reprodutivas.

O gene MC1R parece ser o principal gene no processo de diferenciação de pelagem entre as variedades vermelha e negra em ovinos da raça Morada Nova. Esse estudo permitiu conhecer um pouco mais da variação da cor de pelagem em ovinos dessa raça, além de contribuir para o maior esclarecimento dos padrões de variação de pigmentação em ovinos em geral. Abriram-se novos horizontes para investigações mais refinadas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE OVINOS - ARCO. **Padrão racial ovinos Morada Nova**. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/racas_links/morada_nova.htm>. Acesso em: 20 set. 2014.
- ARANDAS, J. K. G.; RIBEIRO, M. N.; PIMENTA FILHO, E. C.; da SILVA, R. C. B.; FACÓ, O.; ESTEVES, S. N. Estrutura Populacional de Ovinos da Raça Morada Nova. **Anais IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**, João Pessoa-PB, 2012.
- BASTIAENS, M.; HUURNE, J. T.; GRUIS, N.; GRUIS, N.; BERGMAN, W.; WESTENDORP, R.; VERMEER, B. J.; BOUWES BAVINCK. The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.10, n. 16, p. 1701-1708, 2001. doi: 10.1093/hmg/10.16.1701.
- BORDIGNON, M. O.; FRANÇA, A. O. Variação na coloração da pelagem do morcego- pescador *Noctilio leporinus* (L. 1758) (Mammalia, Chiroptera). **Revista brasileira Zootecias**, Juiz de Fora, v. 6, n. 2, p. 181-189, 2004.
- BOSSERHOFF, A. K., ELLMANN, L., QUAST, A.S., EBERLE, J., BOYLE, G. M., KUPHAL, S. Loss of T-cadherin (CDH-13) regulates AKT signaling and desensitizes cells to apoptosis in melanoma. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 8, p. 635 – 647, 2014. doi: 10.1002/mc.22018.
- BUSH, W, S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **Plos Computational Biology**, California, v. 8, n. 12, 2012. doi:10.1371/journal.pcbi.1002822.
- CLARKE, G. M.; ANDERSON, C. A.; PETERSSON, F. H.; CARDON, L. R.; MORRIS, A. P.; ZONDERVAN, K. T. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nature Protocols**. v. 6, n. 2, p. 121–133, 2011. doi:10.1038/nprot.2010.182.
- CREPALDI, P. ;MARILLI, M.;GORNI, C.; MEGGIOLARO, D.; CICOGNA, M.; RENIERI, C. Preliminary study on MC1R polymorphism in some cattle breeds raised in Italy. **Italian Journal of Animal Science**, Italia, v. 2, sup.1, p. 13-15, 2003.

- DESSINIOT, C.; ANTONIOU, C.; KATSAMBAS, A.; STRATIGOS, A.J. Melanocortin 1-receptor variants: functional role and pigmentary associations. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 5, p. 978 -87, 2011. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00970.x.
- DENG, W. D., SHU, W., YANG, S. L., SHI, X. W., AO, H. M. Pigmentation in Black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the MC1R gene. *Mol Biol Rep*, v. 36 p. 431–436, 2009. DOI 10.1007/s11033-007-9197-9.
- DOMINGUES, O. **Carneiro deslanado de Morada Nova**. Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia, v.4, n.1, p.122, 1941.
- DOMINGUES, O. Os carneiros deslanados de Morada Nova. **Revista de Agronomia**, v.9, n.3, p.257-259, 1954.
- FACÓ, O.; PAIVA, S. R.; ALVES, L. R. N. et al. **Raça Morada Nova: origem, características e perspectivas**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2008. (Embrapa Caprinos. Documentos, 75).
- FAO. 2007. **The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture**. Edição de Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Roma.
- FAN, B.; ONTERU, S. K.; DU, Z. Q.; GARRICK, D.J.; STALDER, K.J.; ROTHSCCHILD, M. F. Genome-Wide Association Study Identifies Loci for Body Composition and Structural Soundness Traits in Pigs. **Plos One**, v. 6, n. 2, e14726, 2011.
- FONTANESI, L.; BERITTI, F.; RIGGIO, V.; DALL'OLIO, S.; GONZÁLEZ, E. G.; FINOCCHIARO, R.; DAVOLI, R.; RUSSO, V.; PORTOLANO, B. Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) gene of different goat breeds: association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. **BMC Genetics**, v. 10, n. 47, 2009. Doi: 10.1186/1471-2156-10-47.
- FERREIRA, J.S.B. ; PAIVA, S.R.; SILVA, E.C.; MCMANUS, C.M.; CAETANO, A.R.; FAÇANHA, D.A.E.; SOUSA, M.A.N. Genetic diversity and population structure of different varieties of Morada Nova hair sheep from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 2480-2490, 2014.
- GRATTEN, J.; PILKINGTON, J.G.; BROWN, E. A.; BERALDI, D.; PEMBERTON, J. M.; SLATE, J. The genetic basis of recessive self-colour pattern in a wild sheep population. **Heredity**, v. 104, n. 2, p. 206–214, 2010.
- GARCÍA-GÁMEZ, E.; REVERTER, A.; WHAN V.; MCWILLIAM, S.M.; ARRANZ, J.J.; INTERNATIONAL SHEEP GENOMICS CONSORTIUM; KIJAS, J. Using Regulatory and Epistatic Networks to Extend the Findings of a GenomeScan: Identifying the Gene Drivers of Pigmentation in Merino Sheep. **Plos One**, v. 6, n.6, 2011. e21158. doi:10.1371/journal.pone.0021158

- HAASE, B., SIGNER- HASLER, H., BINNS, M.M., OBEXER- RUFF, G., HAUSWIRTH, R.; BELLONE, R. R.; BURGER, D.; RIEDER, S.; WADE, C. M.; LEEB, T. Accumulating Mutations in Series of Haplotypes at the KIT and MITF Loci Are Major Determinants of White Markings in Franches-Montagnes Horses. **Plos One**, v. 8, n. 9, 2013. e75071. Doi:10.1371/journal.pone.0075071
- HERMUCHE, P. M.; MARANHÃO, R. L. A. ; GUIMARÃES, R. F.; CARVALHO JÚNIOR, O. A.; GOMES, R. A. T.; PAIVA, S. R.; MCMANUS, C. Dynamics of Sheep Production in Brazil. **ISPRS International Journal of Geo-Information**, v. 2, p. 665-679, 2013.
- IBGE, 2013. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Acesso em 09/01/2013. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf >
- JONHSTONN, S. E; MCEWAN, J. C.; PICKERING, N. K.; KIJAS, J.W.; BERARDI, D.; PILKINGTON, J.G.; PEMBERTON, J.M.; SLATE, J. Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 2, p. 2555–2566, 2011. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05076.x.
- KIJAS, J.W.; LENSTRA, J.A.; HAYES, B.; BOITARD, S.; PORTO NETO, L. R.; SAN CRISTOBAL, M.; SERVIN, B.; MCCULLOCH, R.; WHAN, V.; GIETZEN, K.; PAIVA,S.;BARENDSE, W.; CIANI, E.; RAADSMA, H.; H.; MCEWAN, J.; DALRYMPLE, B.; INTERNACIONAL SHEEP GENOMICS CONSORTIUM MEMBERS. Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. **Plos Biology**, v. 10, n. 2, 2012. e1001258. doi:10.1371/journal.pbio.1001258
- KIJAS,J. W., SERRANO, M., MCCULLOCH, R., LI, Y., SALCES, O. J., CALVO, J. H., PÉREZ-GUZMAN, M. D. & THE INTERNATIONAL SHEEP GENOMICS CONSORTIUM. Genome wide association for a dominant pigmentation gene in sheep. **Journal of animal Breeding and Genetics**, v. 130, n. 6, p. 468 – 75, 2013. doi: 10.1111/jbg.12048.
- LAZIZ, I.: ARMAND, A.S.; PARISSET, C.; LECOLLE, S.; DELLA GASPERA, B.; CHARBONNIER, F.; CHANOINE, C. Sprouty gene expression is regulated by nerve and FGF6 during regeneration of mouse muscles. **Growth Factors**, v. 25, n. 3, p. 151 – 159, 2007.
- LI, M. H.; TIIRIKKA, T.; KANTANEN, J. A genome-wide scan study identifies a single nucleotide substitution in ASIP associated with white versus non-white coat-colour variation in sheep (*Ovis aries*). **Heredity (Edinb)**, v. 112, n.2, p. 122-31, 2014. doi: 10.1038/hdy.2013.83.
- LUNDIE, R. S.; WILKINSON, E. J. **The world of coloured sheep**. Timaru: Black and Coloured Sheep Breeders' Association of New Zealand, 2004.

- LEVY, C.; FISHER, D.E. Dual roles of lineage restricted transcription factors: the case of MITF in melanocytes. **Transcription**, v. 2, n. 1, p. 19 – 22, 2011. doi: 10.4161/trns.2.1.13650.
- MIRKENA, T.; DUGUMA,G.; WILLIAN,A.; WURZINGER, M.; HAILE,A.; RISCHKOWSKY, B.; OKEYOS, A. M.; TIBBO, M.; SOLKNER, J. Community-based alternative breeding plans for indigenous sheep breeds in four agro-ecological zones of Ethiopia. **Journal Animal Breeding Genetic**. Ethiopia, v. 29, p. 244–253, 2012.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 6, p. 1215, 1988.
- Mundy, N. I. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage coloration in birds. **Proceedings of the Royal Society**, v. 272, n. 1573, p. 1633-1640, 2005.
- MUNIZ, M.M.M.; SHIOTSUKI, L.; FACÓ, O.; SILVA, K. M.; LOBO, R. N. B.; da SILVA, P. H. T. Características raciais de ovinos da raça Morada Nova e seus impactos sobre o descarte involuntário de animais: resultados preliminares. **Anais da 49a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2012.
- NORRIS, B. J.; WHAN, V.A. A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. **Genome Research**., v. 18, n. 8, p. 1282-93, 2008. doi: 10.1101/gr.072090.107.
- NÚÑEZ, D.; ARIAS, V.; VOGEL, E.; GÓMEZ,L. Internal structure of the Community Assessment of Psychic Experiences-Positive (CAPE-P15) scale: Evidence for a general factor. **Schizophrenia Research**, 2015. doi: 10.1016/j.schres.2015.04.018.
- PAIVA, S.R.; SILVÉRIO, V.C.; EGITO, A. A.; MCMANUS, C.; FARIA, D. A.; MARIANTE, A. S.; CASTRO, S. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; DERGMAN,J. A. Genetic variability of the brazilian hair sheep breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 887-893, 2005.
- PHILIPP, U.; LUPP, B.; MOMKE, S.; STEIN,V.; TIPOLD, A.; EULE, J. C.; REHAGE, J.; DISTL, O. A MITF Mutation Associated with a Dominant White Phenotype and Bilateral Deafness in German Fleckvieh Cattle. **Plos One**, v.6,n. 12, 2011.
- PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD- BROWN, K., THOMAS, L.; FERREIRA, M. A.; BENDER, D.; MALLER, J.; SKLAR, P.; de BAKKER, P. I.; DALY, M.J.; M.J.; SHAM, P.C. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559 – 75, 2007.
- PRICE, A. L.; PATTERSON, N. J.; PLENGE, R. M.; WEINBLATT, M. E.; SHADICK, N. A.; REICH, D. Principal components analysis corrects for

- stratification in genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v.38, p. 904 – 909, 2006.
- REN, J.; MAO, H.; ZHANG, Z.; XIAO, S.; DING, N.; HUANG, L. A 6-bp deletion in the TYRP1 gene causes the brown colouration phenotype in Chinese indigenous pigs. **Heredity**, v. 106, n. 5, p. 862–868, 2011.
- RIGGIO, V.; MATIKA, O.; PONG-WONG, R. Genome-wide association and regional heritability mapping to identify loci underlying variation in nematode resistance and body weight in Scottish Blackface lambs. **Heredity (Edinb)**, v. 110, n. 5, p. 420-9, 2013. Doi: 10.1038/hdy.2012.90
- ROYO, L. J.; ÁLVAREZ, I.; ARRANZ, J.J.; FERNÁNDEZ, I.; RODRÍQUEZ, A.; PÉREZ-PARDAL, L.; GOYACHE, F. Differences in the expression of the *ASIP* gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. **Animal Genetic**, v. 39, n. 3, p. 290-3, 2008. doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01712.x.
- SHIOTISUKI, L.; FACÓ, O. **Núcleo de melhoramento genético participativo de ovinos da raça Morada Nova**. Palestras do VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas em Pequenos Ruminantes y Camélidos Sudamericanos – Shiotsuki e Facó, p.69-78, 2013.
- VAGE, D. I., KLUNGLAND, H., LU, D., CONE, R. D. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. **Mammalian Genome**, v. 10, p.39–43, 1999.
- VAN AMERONGEN, R., FUERER, C., MIZUTANI, M., NUSSE, R. Wnt5a can both activate and repress Wnt/ β -catenin signaling during mouse embryonic development. **Developmental Biology**, v. 369, n. 1, p. 101 – 114, 2012. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.06.020.
- WERF, J. V. DER. Teoria da seleção e componentes da mudança genética. In: **Melhoramento Animal: uso de novas tecnologias**. CAP. 21. Kinghorn, B.; Van der Werf, J.; Ryan M. Traduzido por Vânia Cardoso e Roberto Carvalheiro. FEALQ : Piracicaba, 2006. p. 323-335.
- Wright, S. *Evolution and the Genetics of Populations*. v. IV. Variability Within and Among Natural Populations, **University of Chicago Press**, Chicago, 1978.
- YANG, G.L.; FU, D.L.; LANG, X. et al. Mutations in MC1R Gene Determine Black Coat Color Phenotype in Chinese Sheep. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 8, 2013. Article ID 675382. doi.org/10.1155/2013/675382.
- ZHANG, L.; LIU, J.; ZHAO, F. Genome-Wide Association Studies for Growth and Meat Production Traits in Sheep. **Plos One**, v. 8, n. 6, 2013.
- ZHAO, X.; DITTMER, K.E.; BLAIR, H.T.; THOMPSON, K.G.; ROTHSCHILD, M.F.; GARRICK, D. J. A Novel Nonsense Mutation in the DMP1 Gene Identified by a Genome-Wide Association Study Is Responsible for Inherited

Rickets in Corriedale Sheep. **Plos One**, v. 6, n. 7, 2011.
doi:10.1371/journal.pone.0021739