

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS
ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA
PARA A SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL**

CAMILA SOUZA RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2023**

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS
ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA
PARA A SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL**

ALUNA: CAMILA SOUZA RODRIGUES

ORIENTADORA: CONCEPTA MCMANUS PIMENTEL, PhD

CO-ORIENTADORA: DANIELLE ASSIS DE FARIA, PhD

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: Junho/23

**BRASÍLIA/DF
JUNHO de 2023**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

RODRIGUES, C. S. Desenvolvimento e validação em um painel de SNPs associados a características de importância econômica para a seleção de ovinos de diferentes raças no Brasil. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 153 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

RODRIGUES, C. S. Desenvolvimento e validação em um painel de SNPs associados a características de importância econômica para a seleção de ovinos de diferentes raças no Brasil. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 153 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2023.

1. Marcadores moleculares. 2. *Ovis aries*. 3. Fluidigm. 4. Genotipagem. 5. Melhoramento genético.

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS
ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA
PARA A SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL**

CAMILA SOUZA RODRIGUES

**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:

**CONCEPTA MCMANUS PIMENTEL, PhD (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)**

**ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)
(EXAMINADOR)**

OLIVARDO FACÓ, PhD (Embrapa Caprinos e Ovinos) (EXAMINADOR)

BRASÍLIA/DF, 27 de Junho de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo! Obrigada por sempre cuidar de mim e me guiar pelos melhores caminhos!

Agradeço de coração às minhas orientadoras. Muito obrigada Dra. Connie McManus por ter aceitado me orientar e ter contribuído de forma enriquecedora para a realização deste trabalho e para a minha formação no mestrado.

Muito obrigada Dra. Danielle Assis de Faria, por todos os ensinamentos, orientações, pelo seu profissionalismo, paciência, dedicação e amizade. Sua contribuição para a minha formação profissional foi muito grande!

Gostaria de agradecer ao Dr. Samuel Paiva, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela confiança no meu trabalho e pela oportunidade de trabalhar e aprender tanto no Laboratório de Genética Animal. Muito obrigada!

Quero agradecer também à Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Animais, pela oportunidade de realizar o curso e por todo o apoio fornecido durante a minha formação.

Sou grata à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro que permitiu a minha dedicação integral ao curso.

Agradeço de coração à minha família, que sempre me apoiou em tudo o que me propus a fazer, em especial aos meus amados pais.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional, o meu sincero agradecimento a todos!

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Problemática e Relevância	2
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Breve Histórico da Ovinocultura no Brasil e no Mundo.....	5
3.2 Tecnologias de Genotipagem de Marcadores SNPs e Uso da Plataforma Fluidigm	7
3.3 Melhoramento Genético e Características Relacionadas às Enfermidades que Acometem os Rebanhos	11
3.4 Melhoramento Genético e Características Relacionadas à Produção Ovina.....	14
3.5 Conservação dos Recursos Genéticos Ovinos no Cenário Nacional	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2	25
1. INTRODUCTION.....	30
2. MATERIAL AND METHODS	33
2.1 Animal Samples	33
2.2. Genotyping Methodologies	35
2.3. Data Analysis	37
3. RESULTS	38
3.1. Quality Control and Linkage Disequilibrium (LD)	38
3.2. Allele Frequency of Locus OAR17_5388531 in Brazilian and North American Sheep	38
3.3. Distribution of TMEM154 Haplotypes in Brazilian and North American Sheep .	39
3.4. Data Comparison among Genotyping Platforms	42
3.5. Differences in Allele Frequencies among Santa Inês Populations.....	43
4. DISCUSSION	44
5. CONCLUSIONS.....	48
6. REFERENCES.....	49
SUPPLEMENTARY MATERIALS.....	53

CAPÍTULO 3	58
RESUMO	59
ABSTRACT	61
1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 Amostragem Animal	66
2.2 Genotipagem das Amostras.....	66
2.3 Análise de dados	69
3. RESULTADOS	70
3.1 Controle de Qualidade.....	70
3.2 Frequências alélicas e haplotípicas dos SNPs relacionados ao <i>scrapie</i> em ovinos do Brasil	71
3.4 Frequências alélicas dos SNPs associados aos chifres e criptorquidismo em ovinos	76
3.5 Frequências alélicas de outros SNPs associados a doenças em ovinos	79
3.6 Fluxo gênico entre diferentes populações da raça Santa Inês	81
4. DISCUSSÃO.....	84
5. CONCLUSÕES.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS.....	99
CAPÍTULO 4	102
RESUMO	103
ABSTRACT	105
1. INTRODUÇÃO	107
2. MATERIAL E MÉTODOS	110
2.1 Amostragem Animal	110
2.2 Genotipagem das Amostras.....	110
2.3 Análise de dados	114
3. RESULTADOS	115
3.1 Controle de Qualidade.....	115
3.2 SNPs relacionados a prolificidade em ovinos	116
3.3 SNPs relacionados a cor de pelagem em ovinos	123
3.4 Análise de fluxo gênico entre diferentes populações da raça Santa Inês	126
3.5 Validação da metodologia Fluidigm	130
4. DISCUSSÃO.....	132
5. CONCLUSÕES.....	142

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXOS.....	149

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA PARA SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL, Camila Souza Rodrigues, Mestranda e Concepta McManus, PhD, Brasília – DF

O Brasil possui rebanhos ovinos de raças especializadas e adaptadas às condições climáticas do país. Apesar disso, muito pode ser feito para assegurar o melhoramento genético desses animais e contribuir para o crescimento do setor. Algumas características importantes para os programas de melhoramento genético de ovinos no país incluem a eficiência reprodutiva e a resistência a doenças. O objetivo nesse trabalho foi desenvolver e validar um painel reduzido de SNPs associados a essas características, visando a seleção de ovinos de importância para a ovinocultura nacional. 96 SNPs foram genotipados através da plataforma Fluidigm, utilizando em 15 raças ovinas: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Somalis Brasileira, Bergamácia Brasileira, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel e Barriga Negra, totalizando 1040 amostras de sangue e 112 amostras de sêmen mantidas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA). Com base nos resultados obtidos pela plataforma, foram estimadas as frequências alélicas e haplotípicas para os marcadores associados as características de interesse. Ainda, foram comparados os resultados obtidos nas diferentes populações da raça Santa Inês, com o objetivo de verificar a existência de diversidade alélica entre elas. Além disso, dados de amostras em comum genotipadas com os BeadChips Illumina OvineSNP50 e Illumina OvineSNP 600K, consideradas tecnologias robustas de genotipagem, foram comparados com os dados obtidos aqui. No total, dos 96 SNPs genotipados, 25 falharam, o que indica que o aproveitamento do painel foi de 74%. Além disso, alguns SNPs foram monomórficos, totalizando 18. Com isso, o painel pode ser otimizado em estudos

futuros, excluindo marcadores monomórficos e que não funcionaram, garantindo assim um maior custo-benefício e eficiência dos marcadores genotipados. Os SNPs bem-sucedidos forneceram resultados interessantes, sendo possível estimar frequências alélicas e haplotípicas que podem ser úteis em estudos de melhoramento genético com ovinos no país. Foi possível ainda observar a existência de diferenças nas frequências alélicas entre diferentes populações da raça Santa Inês, demonstrando que há fluxo gênico entre essas populações. Por fim, foi possível concluir que a tecnologia Fluidigm é confiável, sendo uma ferramenta útil e financeiramente viável em estudos de seleção genética com ovinos no Brasil.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, *Ovis aries*, Fluidigm, genotipagem, melhoramento genético.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SNP PANEL OF MARKERS ASSOCIATED WITH TRAITS OF ECONOMIC IMPORTANCE FOR THE SELECTION OF SHEEP FROM DIFFERENT BREEDS IN BRAZIL, Camila Souza Rodrigues, Master's student and Concepta McManus, PhD, Brasília - DF

Brazil has highly specialized sheep herds that are adapted to the country's climatic conditions. Despite this, there is a need for actions to ensure the genetic improvement and contribute to the growth of the sector. Some crucial traits for sheep genetic improvement programs include reproductive efficiency, coat color and disease resistance. The main goal of this work was to develop and validate a reduced panel of SNPs associated with these traits, aiming at the selection of sheep of locally adapted Brazilian breeds. 96 SNPs were genotyping using the Fluidigm platform, with 1040 blood samples from animals of 15 important breeds for national sheep farming, namely: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Brazilian Somali, Brazilian Bergamasca, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel and Barriga Negra. Semen samples (N = 112) of these breeds, maintained at the Brazilian Animal Germplasm Biobank (BBGA) were also included in the study. Based on the results obtained by the platform, allele and haplotype frequencies were estimated for the markers associated with characteristics of interest. Furthermore, the results obtained in the different populations of the Santa Inês breed were compared, with the objective of verifying the existence of allelic diversity among them. In addition, genotyping data from samples in common with BeadChips Illumina OvineSNP50 and Illumina OvineSNP 600K, considered robust genotyping technologies, were compared with the data obtained here. Of the 96 SNPs genotyped, 25 failed, which indicates that the panel efficiency was 74%. In addition, some SNPs were monomorphic, totaling 18. With this, the panel can be optimized in future studies, excluding monomorphic markers and those that did not work, thus ensuring greater cost-effectiveness and efficiency of the genotyped markers. The successful SNPs provided interesting results, making it possible to estimate allele and haplotype frequencies,

which may be useful in genetic improvement studies with sheep in the country. It was also possible to observe the existence of differences in allele frequencies between different populations of the Santa Inês breed, demonstrating that there is gene flow between these populations. Finally, it was possible to conclude that Fluidigm technology is a reliable and financially viable tool for genetic selection programs with sheep in Brazil.

Key words: Molecular markers, *Ovis aries*, Fluidigm, genotyping, genetic improvement.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problemática e Relevância

A ovinocultura é uma atividade de grande importância econômica em todo o mundo. No Brasil, os maiores desafios dessa atividade incluem a baixa oferta e a necessidade de otimização da qualidade do produto. Com isso, ainda é necessário importar carne ovina proveniente de outros países, como o Uruguai (MAPA, 2018). Apesar disso, o Brasil possui rebanhos tanto de raças especializadas quanto de raças adaptadas às condições climáticas do país e grande potencial para o crescimento da produção nacional. Atualmente, a estimativa é de que o rebanho nacional tenha aproximadamente 20,6 milhões de cabeças, que se concentram principalmente na região Nordeste (IBGE, 2021).

De modo geral, os ovinos (*Ovis aries*), são animais rústicos e eficientes em termos de adaptabilidade e resistência às adversidades climáticas (Sejian et al., 2019). Além de rústicas, as raças adaptadas ao semiárido brasileiro são deslanadas e bastante exploradas na produção de carne e pele. Essas raças possuem grande importância no contexto socioeconômico da região Nordeste do Brasil (Rego Neto et al., 2014). Alternativamente, no Sul do país, a criação ovina se baseia em raças lanadas, utilizadas na produção de lã e / ou carne (Silva et al., 2013).

Apesar da importância que a ovinocultura exerce em vários estados brasileiros, muito pode ser feito para assegurar o melhoramento genético desses animais e contribuir para o crescimento do setor. Algumas características específicas são cruciais para os programas de melhoramento genético de ovinos no país, como por exemplo a eficiência reprodutiva dos animais. Além disso, visando a otimização do setor, é necessário aprimorar a qualidade da produção, selecionando características que promovam o bem-estar animal, como tolerância ao calor e resistência a doenças (McManus et al., 2020a).

Atualmente, polimorfismos de base única (*SNP* - *Single Nucleotide*

Polymorphism) são uma ferramenta poderosa em estudos de melhoramento e conservação da diversidade genética animal (Cortes et al., 2022). As maiores vantagens dos SNPs incluem sua abundância no genoma e sua capacidade para uma análise automatizada de alto rendimento a custo moderado (Turchetto-Zolet, 2017). Em animais de produção, para muitas características, estudos de melhoramento genético podem ser otimizados quando se utiliza SNPs em comparação a outros métodos (Koopae & Koshkoiyeh, 2014).

Com o objetivo de desenvolver ferramentas de apoio capazes de auxiliar nos estudos de melhoramento genético, foi criado o Consórcio Internacional do Genoma Ovino (<http://www.sheepmap.org>), que contou com a colaboração do Brasil (Kijas et al., 2012). Essa iniciativa possibilitou a contínua melhoria da montagem do genoma ovino e o desenvolvimento de painéis de marcadores de alta, média e baixa densidade. A eficiência é a maior vantagem dos painéis de SNPs de baixa densidade, uma vez que estes são direcionados para características genéticas específicas que impactam diretamente a ovinocultura.

Painéis de SNPs de baixa densidade podem ter uma ampla gama de aplicações em genética animal, incluindo rastreabilidade e certificação racial, como é feito em ovinos de raças brasileiras, como a Santa Inês e a Morada Nova (Paim et al., 2019). Com essa tecnologia, é possível ainda, otimizar pesquisas de melhoramento e conservação genética das raças de forma eficiente a custo reduzido. Essas ferramentas possuem papel crucial nos programas de conservação *in situ*, aprimorando a seleção dos animais mantidos em núcleos de conservação. Além disso, podem atuar melhorando a identificação de animais doadores de germoplasma (sêmen e embriões) para bancos genéticos, como o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), mantido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília - DF.

O uso de painéis reduzidos de SNPs apresenta várias vantagens em programas de seleção genética, como dito anteriormente. O painel pode conter marcadores associados a uma variedade de características importantes, sendo capaz de fornecer informações essenciais de forma rápida, eficiente e economicamente viável. A validação de tecnologias desse tipo tem um papel crucial na potencialização da cadeia produtiva ovina, disponibilizando técnicas de última geração, como o que já está sendo aplicado nos grandes centros mundiais de produção e consumo de produtos oriundos da atividade pecuária.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um painel de marcadores SNPs para seleção de ovinos de diferentes raças no Brasil, com base em genes que estão correlacionados com a prolificidade (número de cordeiros por parição), variação na cor de pelagem, resistência/susceptibilidade ao *scrapie*, à pneumonia progressiva ovina, a associação entre presença/ausência de chifres e criptorquidismo e outras doenças que afetam os rebanhos.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a frequência de alelos/haplótipos de susceptibilidade/resistência às principais doenças de interesse para a ovinocultura no Brasil, nos rebanhos e no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA).
- Estimar frequências alélicas e haplotípicas para algumas características de interesse econômico em ovinos de diferentes raças presentes no Brasil.
- Comparar a eficiência dos dados de genotipagem fornecidos pelo painel de baixa densidade com os dados obtidos por duas metodologias robustas: Illumina OvineSNP50 e Illumina OvineSNP 600K BeadChips.
- Comparar as diferentes populações da raça Santa Inês e verificar a existência de fluxo gênico entre elas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Breve Histórico da Ovinocultura no Brasil e no Mundo

Acredita-se que os ovinos (*Ovis aries*) sejam descendentes do muflão-asiático (*Ovis-orientalis*), e que a domesticação desses animais tenha ocorrido por volta de 10.000 anos atrás na região do Crescente Fértil (Demirci et al., 2013). O cruzamento seletivo de ovinos começou logo após a domesticação da espécie, com o objetivo de melhorar certas características nos animais. A diferenciação entre populações locais de ovelhas e o surgimento de raças foi intensificada a partir do século 18, quando o cruzamento dos animais começou a ser realizado de forma sistemática e com objetivos definidos (Ciani et al., 2020). Atualmente, existe uma grande variedade de raças locais e transfronteiriças de ovinos, adaptadas a diferentes tipos de ambientes e com diferentes características de interesse comercial. Estudos anteriores revelaram uma evidente correlação entre diferenciação genética e distância geográfica em raças de ovinos, que pode ser explicada pela atividade migratória sazonal humana (Kijas et al., 2012; Costello e Svensson, 2018).

No Brasil, o primeiro registro de ovinos foi feito em 1556, quando esses animais foram introduzidos no país pelos colonizadores portugueses. As primeiras raças a entrar no país eram lanadas e de pequeno porte, originárias da península Ibérica (Villela, 2021). Ao longo de cinco séculos, as raças introduzidas pelos europeus adquiriram novas características, através de processos evolutivos de adaptação ao ambiente e ao clima, sendo atualmente denominadas raças “locais”, “crioulas” ou “naturalizadas” (Paiva et al., 2019). Inicialmente, assim como no resto do globo, os ovinos do Brasil eram mantidos principalmente para a produção doméstica de carne, leite e couro (Costa et al., 2019).

Atualmente, o Brasil conta com um rebanho de ovinos de cerca de 20,6

milhões de cabeças, sendo que o estado da Bahia detém o maior rebanho do país, com 22,8% do rebanho nacional, seguido de Pernambuco e Rio Grande do Sul, com 16% e 14,3%, respectivamente (IBGE, 2021). Consideradas pioneiras na criação de ovinos no Brasil, as regiões Nordeste e Sul possuem a maior distribuição desses animais no país. Além do consumo de carne e leite, a produção de lã possuía grande importância para a economia da região Sul, até a crise da lã, que começou no final da década de 1980 e se estendeu até a década de 1990. O fato culminou com a diminuição da produção de lã gaúcha, levando a uma redução dos rebanhos da região (Ávila et al., 2013). Com isso, o Nordeste se tornou a região mais proeminente na criação de ovinos no Brasil, com o cultivo/manejo voltado para raças localmente adaptadas deslanadas. Hoje a região detém a maior parcela de participação na ovinocultura nacional, com 70,6% do rebanho (IBGE, 2021).

As raças ovinas brasileiras podem ser primariamente divididas em lanadas e deslanadas. As raças lanadas são representadas por animais cuja importância econômica é focada na produção de lã, como a raça brasileira Crioula Lanada. As raças deslanadas são compostas por animais cuja importância varia desde a produção de carne e leite, até a produção de pele e couro, com alta demanda no mercado de roupas (Jacinto et al., 2004). Dentre as deslanadas destacam-se as raças Morada Nova, Santa Inês, Rabo Largo, Somalis Brasileira e Barriga Negra (McManus et al., 2013).

Além das raças mencionadas acima, há ainda outras que possuem grande importância no cenário da ovinocultura nacional. Consideradas raças comerciais, com aptidão principalmente para a produção de carne, destacam-se os ovinos Texel, Hampshire, Suffolk e Ile de France (McManus et al., 2013). Os autores citados anteriormente destacam ainda, a raça Corriedale, que possui aptidão para a produção de lã, e as raças Dorper e Dâmara, ambas raças de corte que possuem grande importância comercialmente. Apesar de serem oriundas de outros países, essas raças conseguiram se adaptar bem às condições ambientais e climáticas brasileiras.

Ainda que seja considerada uma atividade pecuária de grande importância para o mercado brasileiro, a ovinocultura está inserida em um cenário bastante delicado, uma vez que a produção nacional não consegue suprir com eficiência a demanda dos consumidores. Um dos maiores desafios pecuários atuais é suprir essa necessidade, o que pode ser realizado através da otimização dos programas de seleção genética de ovinos, que visem aumentar a oferta, mas principalmente aprimorar a qualidade do produto (McManus et al., 2020a).

3.2 Tecnologias de Genotipagem de Marcadores SNPs e Uso da Plataforma Fluidigm

A sigla SNP tem origem da língua inglesa, sendo abreviação para *Single Nucleotide Polimorfism* ou Polimorfismo de base única. SNPs são a forma mais comum de variação dentro do genoma, e são frequentemente utilizados em estudos que visam identificar diferenças genéticas entre indivíduos e populações (Cortes et al., 2022). Basicamente, um SNP pode ser definido como a alteração de uma única base em uma sequência de DNA, e embora SNPs multialélicos existam, esses marcadores são usualmente bialélicos (Morgil et al., 2020).

Marcadores SNPs podem ser encontrados na região codificante (*exons*), intergênica ou não codificante (*introns*), no entanto, na maioria das vezes, estão localizados em espaços intergênicos, que não possuem função determinada (Dijk et al., 2014; Koopae e Koshkoiyeh, 2014). Os SNPs ocorrem ao longo do genoma e possuem baixo custo de genotipagem com alta taxa de repetibilidade, confiabilidade e automação. Com isso, são as ferramentas atualmente mais utilizadas em estudos genéticos com objetivos diversos (Koopae e Koshkoiyeh, 2014).

Atualmente, a prospecção e genotipagem de SNPs colabora de maneira extraordinária para o melhoramento e conservação de recursos genéticos dos animais domésticos, incluindo a espécie ovina. Conforme mencionado por Jiang et al (2014), com a realização do sequenciamento completo do genoma ovino, esforços foram desenvolvidos com o propósito de encontrar marcadores SNPs. Avanços tecnológicos tornaram possível a criação de chips de genotipagem de baixa (>100) (Beynon et al., 2015), média (>50k) (Sandenbergh et al., 2016) e alta densidade (>600k) (Anderson et al., 2014). Através do advento do sequenciamento completo do genoma ovino (ISGC, 2023), hoje essas ferramentas podem contribuir de forma significativa para o melhoramento genético desses animais.

As empresas Illumina (Illumina Inc.) e Affymetrix (Affymetrix Inc.) são consideradas as principais provedoras de chips de genotipagem, oferecendo uma ampla gama de SNP-chips espécie-específicos, muito utilizados comercialmente (Marina et al., 2021). Na genotipagem Illumina BeadArrayTM, também conhecida como tecnologia de microarray, são utilizadas microesferas de sílica revestidas com oligos específicos, que são alojadas em micropoços padronizados, com várias cópias de uma sonda oligonucleotídica direcionada a um locus específico no genoma (Marina et al., 2021). Embora existam algumas diferenças nas

tecnologias de genotipagem Illumina Infinium BeadChips™ e Affymetrix Axiom™, ambas oferecem chips de genotipagem de alta densidade (*high-density* - HD) que são comumente utilizados em estudos de GWAS (*Genome Wide Association Studies*) e Seleção Genômica (*Genomic Selection*) (Berry et al., 2016).

Nas últimas décadas, a evolução em soluções genômicas de genotipagem de marcadores promoveu uma redução significativa nos custos de aquisição de dados de milhares de SNPs através dos chips de alta densidade. No entanto, ainda existe um grande interesse no desenvolvimento de painéis de baixa densidade customizados para teste de paternidade, certificação racial, certificação de origem de produtos, e triagem de polimorfismos em genes candidatos para características de interesse econômico (Barry et al., 2019; Nicol et al., 2009; Galloway et al., 2000; Silva et al., 2011). Painéis de baixa densidade previamente desenvolvidos e validados, apresentaram resultados promissores em testes de paternidade em ovinos (Heaton et al., 2014; Tortereau et al., 2017; Berry et al., 2019). Além disso, também demonstraram eficiência em ensaios relacionados a doenças (Faria et al., 2018; Bchara et al., 2018), e na detecção de polimorfismos em genes associados à prolificidade ovina (Paiva et al., 2016).

Dentre as tecnologias de genotipagem atuais, destacam-se as plataformas que permitem uma maior flexibilidade na genotipagem de SNPs específicos, possibilitando a personalização de um estudo de forma rápida e economicamente viável. A plataforma Fluidigm é considerada um sistema de genotipagem flexível, e possui como suas maiores vantagens a redução significativa do consumo de reagentes e dos custos de mão de obra (Fluidigm, 2018). Além disso, sistemas de genotipagem flexíveis são ideais para analisar SNPs funcionais e haplótipos para características específicas (Thomson, 2014).

A plataforma Fluidigm possui um sistema de Circuitos Fluídicos Integrados (IFCs), que mistura reagentes de PCR de forma automática, por meio de redes de canais microfluídicos (Seo et al., 2020). Os IFCs podem ser de diferentes formatos, como por exemplo os IFCs de 48.48 e 96.96 (Fluidigm, 2018). No caso dos IFCs de 96.96, é possível testar 96 amostras e 96 marcadores de forma simultânea, ou seja, em uma mesma reação de PCR. Em um lado do quadro, 96 poços acomodam as amostras e, no outro lado, 96 poços acomodam a sonda e os pares de primers. Uma vez alocados nos poços, os componentes são então pressurizados no chip, utilizando um controle IFC (Figura 1). Após isso, os componentes são sistematicamente combinados em um total de 9.216 reações paralelas. Ao fim da reação de PCR, o IFC é escaneado através de um sistema leitor que gera imagens de

fluorescência. A partir daí o software Fluidigm SNP Genotyping Analysis utiliza essas imagens para obter as chamadas de genótipos (Fluidigm, 2018).

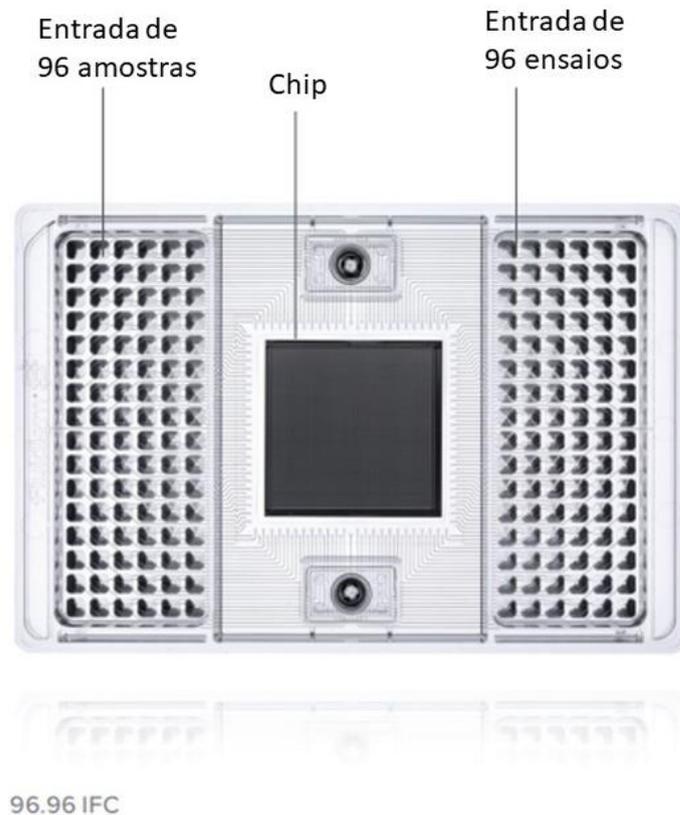


Figura 1. Circuito Fluídico Integrado Fluidigm com capacidade para 96 amostras e 96 SNPs. Fonte: Fluidigm, 2018, com adaptação.

Ainda sobre o processo de genotipagem, este pode ser realizado com ensaios TaqMan[®] ou SNP Type[™]. No caso dos ensaios SNP Type, são utilizados um conjunto de oligonucleotídeos *primer* locus-específico (*Loco-Specific Primer - LSP*), *primer* de amplificação alvo-específico (*Specific Target Amplification - STA*) e *primer* alelo-específico ASP1 e ASP2 (*Allele Specific Primer*). Os ensaios SNP Type são performados com o mesmo conjunto de sondas (FAM[™] e HEX[™]) coradas com corante ROX em todas as reações, o que permite o baixo custo operacional, rapidez e excelência nos resultados (Fluidigm, 2018).

Durante a genotipagem, nos *primers* alelo-específicos, a especificidade do alelo é determinada pela base na extremidade 3' ou próximo a ela, enquanto o *primer* locus-específico desempenha o papel de *primer* reverso durante a reação. Com isso, durante a reação de PCR, o LSP se liga a fita molde de DNA iniciada pelos primers ASP, produzindo

uma fita complementar. A partir daí, ocorre a união da sonda à fita molde sintetizada anteriormente, o que culmina na emissão de fluorescência, que pode então ser lida pelo sistema leitor Fluidigm EP1™. O sistema leitor Fluidigm EP1 realiza a leitura das fluorescências emitidas e, através do software Fluidigm SNP Genotyping Analysis, esses sinais são calculados. O sistema apresenta então um gráfico com os resultados, conforme mostra a figura 2.

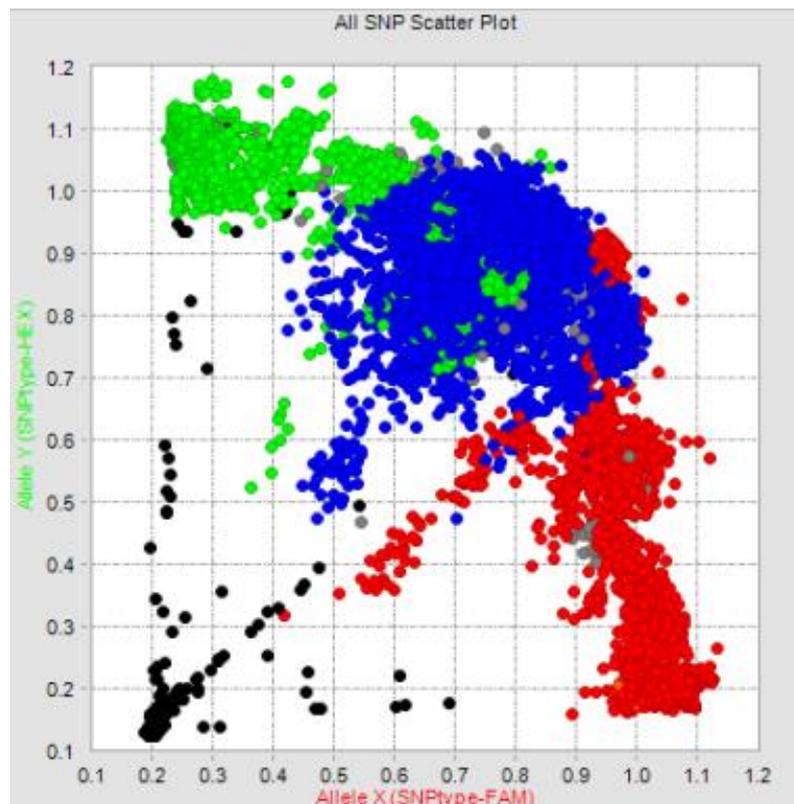


Figura 2. Gráfico de dispersão gerado pelo software Fluidigm SNP Genotyping Analysis.

Fonte: Fluidigm, 2018.

Apesar da popularidade das tecnologias de genotipagem tradicionais, como os BeadChips Illumina OvineSNP50 e o Illumina OvineSNP600K, estes métodos possuem algumas desvantagens. Primeiramente, devido ao alto custo, projetar um painel de SNPs personalizado se torna inviável na maioria dos casos, o que também limita o número de redesenhos do chip, comprometendo a otimização do projeto. Com isso, tecnologias fixas podem ser aplicadas em projetos que visem alcançar resultados mais “universais”. Isso porque permitiriam a distribuição dos custos entre um número maior de pesquisadores, como por exemplo em um modelo de consórcio para projetar chips de genotipagem personalizados que seriam úteis para um maior número de usuários (Thomson, 2014). Dessa forma, como mencionado anteriormente, plataformas de genotipagem flexíveis como a Fluidigm possuem

grandes vantagens, principalmente no âmbito econômico.

3.3 Melhoria Genética e Características Relacionadas às Doenças que Acometem os Rebanhos

Garantir a resistência genética dos animais às doenças é crucial para manter uma ovinocultura bem-sucedida. No geral, pequenos ruminantes possuem histórico de resistência à parasitas e doenças, sendo que esforços já foram realizados com o intuito de desenvolver rebanhos resistentes a enfermidades diversas (Pal & Chakravarty, 2020). Uma das principais doenças que afetam rebanhos de ovelhas em todo o mundo é conhecida como Pneumonia Progressiva Ovina (OPP) ou Maedi-Visna (MV). Essa enfermidade é causada por um Lentivírus de Pequeno Ruminante (SRLV) e pode causar dentre outros sintomas, a perda de peso e problemas respiratórios graves, podendo ser fatal (Peterhans et al., 2004). Heaton et al. (2013) apontaram algumas importantes mutações no gene TMEM154 (*Transmembrane Protein 154*) associadas à susceptibilidade reduzida à doença. Por isso, o gene TMEM154 pode ter um papel crucial na erradicação da doença em rebanhos. Além do gene TMEM154, outras mutações foram associadas à MV, como a região genômica *ZNF389*, que pode ter um papel importante na susceptibilidade/resistência à doença (White et al., 2014).

Assim como a pneumonia progressiva ovina, outra doença que tem o potencial de provocar danos aos rebanhos brasileiros, no caso de introdução no país, é o *scrapie* ou paraplexia enzoótica dos ovinos. Essa enfermidade pertencente ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs), e é causada por um príon. Alguns polimorfismos no gene PRNP (*Prion Protein*) têm sido fortemente correlacionados à resistência e susceptibilidade à doença em ovinos (figura 3), sendo um importante fator genético a ser levado em consideração na seleção de animais resistentes (Prusiner, 1998). Estudos que indiquem a presença ou ausência de determinados haplótipos nos rebanhos nacionais, como os já realizados por Pacheco et al. (2007), Passos et al. (2008), Ianella et al. (2012), Faria et al. (2018) e Andrade et al. (2018) podem auxiliar em tomadas de decisões importantes para o manejo e controle dos rebanhos.

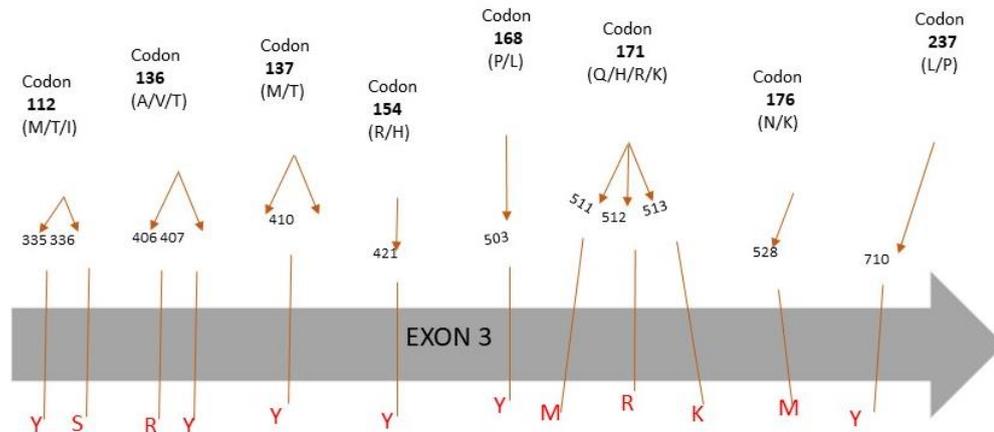


Figura 3. Importantes polimorfismos correlacionados à resistência e susceptibilidade à doença em ovinos e suas respectivas posições no gene PRNP (*Prion Protein*).

Em observações anteriores, produtores de ovinos Morada Nova notaram que a presença de chifres possui efeitos positivos nos animais, enquanto o criptorquidismo, que é a falha na descida dos testículos, impacta negativamente o peso dos animais (Pereira et al., 2018). Em um estudo de anterior de GWAS (dados ainda não publicados), foi identificada uma região no cromossomo 10 ovino, em animais da raça Morada Nova, associada à presença/ausência de chifres, assim como a presença/ausência de testículos formados no escroto do animal. Nessa região, foram prospectados 11 marcadores SNPs com alta correlação significativa entre fenótipo e genótipo para essa característica. A identificação desses marcadores possibilita a genotipagem de reprodutores e matrizes, podendo ser uma ferramenta eficaz na seleção de ovinos, evitando assim, o aparecimento do fenótipo indesejável nos rebanhos nacionais. Além disso, outro marcador SNP identificado como *OAR:g.132619300G>A*, previamente observado em um estudo de GWAS, se mostrou significativamente associado ao fenótipo da presença de chifres no cromossomo dois abaixo do gene *metaxin 2* (MTX2) (He et al., 2016).

Outras doenças já descritas em ovinos podem ser altamente prejudiciais aos rebanhos, causando prejuízos financeiros para produtores de diversos países. A dermatosparaxia é uma dessas condições, sendo uma doença genética que afeta a maturação de colágeno e pode levar à fragilidade da pele (Zhou et al., 2012). De acordo com a literatura, essa doença é causada pelo polimorfismo c.421G>T no gene ADAMTS2 (*metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 2*), e já foi reportada no Brasil em ovinos da raça White

Dorper (Andrade et al., 2014; Silva et al., 2015).

Além da dermatosparaxia, as condrodisplasias são causadoras de prejuízos econômicos em rebanhos ovinos ao redor do globo, afetando o esqueleto dos animais e causando encurtamento da cabeça e nanismo. No Brasil, foram reportados casos de condrodisplasias em cordeiros da raça Cabugi, sendo letal em alguns casos (Dantas et al., 2009). Entende-se que essa condição seja causada por uma transversão T>A em um domínio altamente conservado do gene Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos, do inglês *Fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3) (Beever, et al., 2006). Além disso, em ovinos da raça Texel foi observado que o gene da família transportadora de soluto 13 ou *sodium/sulfate symporters member 1* (SLC13A1) também pode estar ligado a doença (Thompson et al., 2005; Zhao et al., 2012).

A doença de *rickets* ou raquitismo é uma condição autossomal recessiva onde uma dieta deficiente em cálcio e fósforo afetam a absorção e metabolismo da vitamina D no organismo, culminando em problemas no esqueleto dos animais (Dittmer et al., 2009). De acordo com Zhao et al. (2011), a doença é causada por uma mutação no exon 6 (C>T) do gene *dentin matrix protein 1* (DMP1), que resulta em uma proteína não funcional. A doença já foi reportada em diversas raças ovinas, incluindo Suffolk, Hampshire e Blackface (Van Saun, 2004; Hurst et al., 2020).

De acordo com a literatura internacional, a figura 4 demonstra que em uma busca por termos relacionados a doenças genéticas ovinas, o *scrapie* (amarela e azul) e a pneumonia progressiva ovina (roxa) são as enfermidades em maior evidência nos trabalhos científicos. Doenças que afetam o crescimento e o peso dos animais também estão em destaque, além de problemas causados por parasitas (verde).

Factor 9 (GDF9) ou *FecG* (Gene da Fecundidade G), que está localizado no cromossomo 5 em ovinos e pode influenciar de maneira direta as células somáticas circundantes, particularmente nas células da granulosa, do cúmulo e da teca (Castro et al., 2016; Hanrahan et al., 2004; Otsuka et al., 2011). O gene *Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B* (BMPR1B) ou *FecB* (Gene da Fecundidade B), se localiza no cromossomo 6 e tem efeito aditivo no desenvolvimento dos folículos e células granulosas do ovário, sendo responsável pela fecundidade e geminação em ovinos e caprinos (*Capra hircus*) (Hanrahan et al., 2004; Davis, 1982; Mulsant et al., 2003). Entender o papel desses três genes e das mutações associadas a eles é crucial em estudos de melhoramento ovino que visam otimizar a prolificidade dos animais.

Em ovinos, a cor de pelagem é uma importante característica econômica, especialmente nas raças lanadas. Ao longo dos anos, a seleção genética tornou possível uma extensa variedade de tipos de pelagem entre diferentes raças ovinas, o que as tornou modelo para estudos desse tipo (Cieslak et al., 2011). No caso de ovelhas lanadas por exemplo, a cor da lã pode variar naturalmente de branco para cinza ou preto, ou de marrom claro para marrom escuro. Em mamíferos a cor de pelagem é determinada pela interação de múltiplos genes, sendo que os três genes candidatos mais importantes são: *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R), *Agouti Signaling Protein* (ASIP) e *Tyrosinase Related Protein 1* (TYRP1) (Bennett & Lamoreux, 2003; Searle et al., 1968; Vage, 1999). Além desses genes, o gene *Microphthalmia-Associated Transcription Factor* (MITF) e o gene *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog* (KIT) também apresentaram associação positiva com a cor da pelagem dos animais (Li et al., 2014; Fontanesi et al., 2014).

No Brasil, a cor de pele e pelagem é relevante principalmente nos aspectos de adaptação as condições ambientais e preferência do mercado consumidor de lã. No caso de raças brasileiras deslanadas como a Morada Nova e a Santa Inês, a cor de pelagem dos animais pode variar. De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO), existem duas variedades de Morada Nova, a branca e a vermelha. A pelagem de cor vermelha é a mais comum nos rebanhos, especialmente devido a pouca adaptabilidade dos animais de cor branca ao clima do semiárido, algo que vem sendo debatido por autores diversos, como Costa et al. (2015), Leite et al. (2018) e McManus et al. (2020b). De maneira similar, estudos anteriores refutam o que se pensava anteriormente, que animais de pelagem branca da raça Santa Inês tenham menor resistência ao calor (McManus 2011).

No caso de animais lanados, como a raça Crioula Lanada, a alta variação na cor de pelagem é o que torna a lã desses animais um produto de grande valor econômico para os

produtores, especialmente na região Sul do Brasil (ARCO, 2016). Atualmente, sabe-se que a pelagem desses animais é determinada por interações epistáticas principalmente dos genes MC1R e ASIP (Hepp et al., 2016). Entretanto, como mencionado por Cavalcanti et al. (2017), novos estudos que visem identificar os fatores genéticos que determinam a cor da lã nesta raça são essenciais em programas de seleção voltados para cores específicas, que interessam consumidores principalmente da indústria têxtil. Além disso, permitiriam a melhoria de estratégias que visam preservar a diversidade genética da raça, auxiliando na composição ideal de bancos genéticos por exemplo.

Outra característica importante nos programas de seleção genética de animais domésticos é a qualidade da carne, que incluir características como a maciez, suculência e sabor. Em ovinos, um importante gene relacionado a qualidade da carne é a miostatina, que de acordo com Bell et al. (2016) é responsável por controlar a multiplicação de fibras musculares. A inibição da miostatina pode ocasionar em um menor teor de gordura e maior rendimento de carcaça nos animais, sendo uma estratégia para aumentar a produção de carne magra em ovinos. Assim, de acordo com Clop et al. (2006), um importante marcador reportado em ovelhas da raça Texel, denominado *MSTN_6723GA*, no gene da miostatina (GDF8), pode estar associado a essa característica nos animais.

3.5 Conservação dos Recursos Genéticos Ovinos no Cenário Nacional

O termo “recurso genético” engloba toda informação genética, seja ela de origem vegetal, animal ou microbiológica, que tenha valor atual ou potencial (CDB, 2006). Conservar recursos genéticos é fundamental para garantir a segurança alimentar global. A perda de diversidade genética tem causado uma enorme preocupação mundialmente (FAO, 2007). Dois fatores específicos são os principais responsáveis pela perda de diversidade genética de recursos genéticos animais e vegetais principalmente. O primeiro deles é a vulnerabilidade genética, que ocorre quando uma cultura, variedade ou raça amplamente utilizada é susceptível ao ataque de doenças que podem se espalhar e gerar grandes perdas. O segundo fator é a erosão genética, que ocorre quando há a extinção de uma raça ou variedade (FAO, 2007).

Para garantir a preservação dos recursos genéticos, é necessário desenvolver estratégias de conservação multidisciplinares, inclusive a integração dos métodos *ex situ* e *in situ* de forma eficiente (Byers et al., 2013). A conservação *in situ* ocorre em fazendas, campos, lagos e florestas, tendo como um dos principais objetivos permitir a evolução

contínua das espécies alvo (Bellon et al., 2017). Por outro lado, a conservação *ex situ* é realizada principalmente em bancos de sementes e bancos genéticos, sendo um componente importante na conservação de recursos genéticos (McGowan et al., 2016).

No Brasil, esforços para garantir a conservação dos recursos genéticos animais unem a utilização de estratégias *in situ* e *ex situ*, e focam na caracterização genética e importância do uso desses recursos em vários segmentos da sociedade (Paiva et al., 2019). No entanto, com relação à ovinocultura, muito pode ser feito para contribuir para a caracterização e conscientização social com relação às raças naturalizadas. Conhecer a diversidade genética de uma raça, bem como seus parâmetros populacionais é crucial na preservação desta. No nordeste do Brasil, raças ovinas localmente adaptadas, como a Morada Nova e a Santa Inês, passaram por processos de seleção natural que permitiram o desenvolvimento de características específicas, como a tolerância ao calor (McManus et al., 2020). É importante ressaltar ainda que a introdução de animais de raças comerciais permitiu a ocorrência de cruzamentos sem controle, culminando na diminuição das populações de raças adaptadas (Tino et al., 2020).

Tino et al. (2020) estimou parâmetros populacionais para algumas raças adaptadas ao Nordeste brasileiro presentes em um núcleo de conservação no estado do Ceará. De acordo com os autores, parte da genética original dos rebanhos das raças ovinas Morada Nova, Somalis Brasileira e Santa Inês foi perdida, especialmente na raça Somalis Brasileira. Dessa forma, estratégias de conservação *ex situ* como o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), aliados a presença de núcleos de conservação de raças, como a EMBRAPA Caprinos e Ovinos, podem ser grandes aliados na manutenção desses recursos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLI, R. et al. Association of BMPR-1B and GDF9 genes polymorphisms and secondary protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes. **Gene**, v. 524, p. 296–303, 2013.
- ANDERSON, R. et al. Development of a high density (600K) Illumina ovine SNP chip and its use to fine map the yellow fat locus. In: **PROCEEDINGS OF THE (ISGC) PLANT AND ANIMAL GENOMICS XXII CONFERENCE**, 2014.
- ANDRADE, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; DRIEMEIER, D. Identification of single nucleotide polymorphisms in the prion protein gene in Santa Ines and Dorset sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, 2018.
- ANDRADE, D. G. A. et al. Aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da dermatosparaxia em ovinos White Dorper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, P. 6, 2014.
- ARCO, Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/index.php>. Acesso em: 10 de abril de 2023.
- ÁVILA, V.S. et al. O retorno da ovinocultura ao cenário produtivo do Rio Grande do Sul, **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, n. 11, p. 2419-2426, 2013.
- BCHARA, M. et al. Validação de um painel reduzido de marcadores moleculares associados com susceptibilidade ao vírus da pneumonia ovina. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 5., 2018, Fortaleza.
- BEEVER, J.; SMIT, M.A.; MEYERS, S.; et al. A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. **Animal genetics**, v. 37, p. 66-71, 2006.
- BELL, R.A.; AL-KHALAF, V.M.; MEGENEY, L.A. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. **Skeletal Muscle**, v.6, n.16, p.1-13, 2016.

- BELLON, M.R., et al. In situ conservation-harnessing natural and human-derived evolutionary forces to ensure future crop adaptation. **Evol Appl.** v. 6, n. 10, p. 965-977, 2017.
- BENNETT, D.C. & LAMOREUX, M.L. The color loci of mice a genetic century. **Pigment Cell Res.** v. 16, p. 333–344, 2003.
- BERRY, D. P. Low density genotype panel for both parentage verification and discovery in a multi-breed sheep population. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 58, p. 12, mar., 2019.
- BERRY, D.P. et al. Inter- and intra-reproducibility of genotypes from sheep technical replicates on Illumina and Affymetrix platforms. *Genetics Selection Evolution*, v. 48, p. 86, 2016.
- BEYNON, S. E. et al. Population structure and history of the Welsh sheep breeds determined by whole genome genotyping. **BMC Genetics**, v. 16, n. 1, p. 65, 2015.
- BYERS, O., et al. The one plan approach: the philosophy and implementation of CBSG's approach to integrated species conservation planning. **WAZA Magazine**, v. 14, p. 2–5, 2013. Disponível em: <http://www.waza.org/en/site/conservation/integrated-species-conservation>. Acessado em: 23/03/2023.
- CASTRO, F.C., CRUZ, M.H.C., LEAL, C.L.V. Role of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 8, p. 1065-1074, 2016.
- CAVALCANTI, L.C.G.; et al. Genetic characterization of coat color genes in Brazilian Crioula sheep from a conservation nucleus. **Pesq. agropec. bras.**, v.52, n.8, p. 615-622, 2017.
- CBD. **Global Biodiversity Outlook 2** Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, 81 + vii pages, 2006.
- CHU, M. X. et al. Study on BMP15 and GDF9 as candidate genes for prolificacy of Small Tail Han sheep. **Yi chuan xue bao**, v. 32, n. 1, p. 38-45, 2005.
- CIANI, E., et al. On the origin of European sheep as revealed by the diversity of the Balkan breeds and by optimizing population-genetic analysis tools. **Genet Sel Evol.**, v. 52, p. 25, 2020.
- CIESLAK, M. et al. Colours of domestication. **Biological Reviews**, v. 86, n. 4, p.885–899, 2011.
- CLOP, A., et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nat Genet.**, v. 38, p. 813-818, 2006.
- CORTES, O.; CAÑÓN, J.; GAMA, L.T. Applications of Microsatellites and Single Nucleotide Polymorphisms for the Genetic Characterization of Cattle and Small Ruminants: An Overview. **Ruminants**, [S.l.], v. 2, p. 456-470, 2022.
- COSTA, J.A.A. et al. **Atualização das demandas de pesquisa em ovinos de corte do Brasil Central**. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos - n. 8, Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2019. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 21/03/2023.

- COSTA, W. P. et al. Thermoregulatory responses and blood parameters of locally adapted ewes under natural weather conditions of Brazilian semiarid region. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 4589-4600, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n7Sup1p4589>. Acesso em: 10 abr. 2023.
- COSTELLO, E.; SVENSSON, E. **Historical archaeologies of transhumance across Europe**. 1^a ed. New York: Routledge, 2018.
- DANTAS, Francelicia Pereira Marques. **Condrodisplasia hereditária em ovinos da Raça Cabugi**. 2009. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia), Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande - Patos - Paraíba - Brasil, 2009. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/25025>. Acesso em: 23/03/2023.
- DAVIS, G.H., et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. **Nr.Z. JI agric. Res.**, v. 25, p. 525-529, 1982.
- DEMIRCI, S., et al. Mitochondrial DNA diversity of modern, ancient and wild sheep (*Ovis gmelinii anatolica*) from Turkey: new insights on the evolutionary history of sheep, **PLoS One**, 8, e81952, 2013.
- DIJK, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends Genet.** v. 30, p. 418-426, 2014.
- DITTMER, K.E.; THOMPSON, K.G.; BLAIR, H.T. Pathology of inherited rickets in Corriedale sheep. **J Comp Pathol.**, v. 141 n. 2, p. 147-55, 2009.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) **The state of the world's animal genetic resource for food and agriculture** (Eds. B. RISCHKOWSKY e D. PILLING). Roma, Italy, 2007, 512p.
- FARIA, D. A. et al. Validação de um painel reduzido de marcadores moleculares relacionados à susceptibilidade ao scrapie em ovinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 5., 2018, Fortaleza.
- FLUIDIGM CORPORATION. **SNP Genotyping User Guide (PN 68000098 Q1)**. Disponível:<https://fluidigm.my.salesforce.com/sfc/p/#700000009DAw/a/4u0000019kFV/J5w6q0CKYdlTv5ebT5PYx8Ai2T5oGz.CIYtyMxHAWFg>. Acesso em: 21/01/2023.
- FONTANESI, L., et al. A frameshift mutation in the melanophilin gene causes the dilute coat colour in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) breeds. **Anim Genet.**, v. 45, n. 2, p. 248-55, 2014.
- GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature genetics**, v. 25, n. 3, p. 279-283, 2000.
- HANRAHAN, J. P. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 900-909, 2004.
- HE, X.; ZHOU, Z.; PU, Y.; et al. Mapping the four-horned locus and testing the polled locus in three Chinese sheep breeds. **Anim Genet.**, v. 47, n. 5, p. 623-7, 2016.

- HEATON, M. P. et al. Genetic Testing for TMEM154 Mutations Associated with Lentivirus Susceptibility in Sheep. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55490, 2013.
- HEATON, M. P. et al. SNPs for parentage testing and traceability in globally diverse breeds of sheep. **PLOS ONE**, v. 9 n. 4 p. e94851, 2014.
- HEPP, D. et al. Epistatic interaction of the Melanocortin 1 Receptor and Agouti Signaling Protein genes modulates wool color in the Brazilian Creole Sheep. *Journal of Heredity*, v. 107, n. 6, p. 544-552, 2016.
- HURST, E. et al. Rickets in Scottish blackface lambs on five South West Scotland farms. **Veterinary Record Case Reports**, v. 8, n. 1, e001008, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/vetreccr-2019-001008>. Acesso em: 10 abr. 2023.
- IANELLA, P.; MCMANUS, C.M.; CAETANO, A.R.; PAIVA, S.R. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: Issues for conservation and breeding programs. **Res Vet Sci.**, v. 90, p. 2019-225, 2012.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal (PPM)**. Rio de Janeiro: IBGE. 2021.
- INTERNATIONAL SHEEP GENOME CONSORTIUM (ISGC). Disponível em: < <http://www.sheepmap.org/> > Acesso em: 24/03/2023.
- JACINTO, M. A. C. et al. Características anátomo-estruturais da pele de ovinos (*Ovis aries* L.) lanados e deslanados, relacionadas com o aspecto físico-mecânico do couro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 4, p. 1001-1008, 2004.
- JIANG, Y. et al. The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 344, n. 6188, p. 1168–73, 2014.
- KIJAS, J.W. et al. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. **PLoS Biol.**, v. 10, n. 2, p. 14, 2012.
- KOOPAEE, H.K.; KOSHKOIYEH, A.E. SNPs genotyping technologies and their applications in farm animals breeding programs: review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, n. 1, p. 87-95, 2014.
- LEITE, J. H. G. M. et al. Locally adapted Brazilian ewes with different coat colors maintain homeothermy during the year in an equatorial semiarid environment. **International Journal of Biometeorology**, v. 62, p. 1635-1644, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1563-x>. Acesso em: 10 abr. 2023.
- LI, M.-H., et al. 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**, 112(2), pp.122–31, 2014.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/importacao-de-produtos-de-origem-animal>>. Acesso em: 07/04/2023.
- MARINA, H., et al. Study on the concordance between different SNP-genotyping platforms in sheep. **Anim Genet.**, v. 52, n. 6, p. 868-880, 2021.
- MCGOWAN, P.J.K., et al. IUCN Guidelines for Determining When and How Ex Situ

- Management Should Be Used in Species Conservation. **Conserv. Lett.** v. 10, p. 361–366, 2016.
- MCMANUS, C.; LOUVANDINI, H.; GUGEL, R.; SASAKI, L. C. B.; BIANCHINI, E.; BERNAL, F. E. M.; PAIVA, S. R.; PAIM, T. P. Skin and coat traits in sheep in Brazil and their relation with heat tolerance. *Tropical Animal Health and Production*, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2011.
- MCMANUS, C. et al. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. **Brazilian Journal of Science and Technology** 1, 3, 2013.
- MCMANUS, C. et al. Landscape genetics of sheep in Brazil using SNP markers. **Small Rumin. Res.**, v. 192, p. 106239, 2020a.
- MCMANUS, C. M. et al. Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? *Theriogenology*, v. 155, p. 157-167, 2020b.
- MORGIL, H.; CAN GERCEK, Y.; TULUM, I. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Plant Genetics and Breeding. In: **THE RECENT TOPICS IN GENETIC POLYMORPHISMS. IntechOpen**, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.91886>. Acesso em: 10 abr. 2023.
- MULSANT, P., et al. Prolificacy genes in sheep: the French genetic programmes. **Reprod Suppl.**, v. 61, p. 353-359, 2003.
- NICOL, L. et al. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. **Reproduction**, v. 138, n. 6, p. 921–933, 2009.
- NIU, Z. G., et al. The Identification of Mutation in *BMP15* Gene Associated with Litter Size in Xinjiang Cele Black Sheep" **Animals**, v. 11, p. 668-670, 2021.
- OTSUKA, F.; MCTAVISH, K. J.; SHIMASAKI, S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 1, p. 9–21, 2011.
- PACHECO, A. C. L.; OLIVEIRA, S. M. P.; GOUVEIA, J. J. S.; et al. Analysis of prion protein gene (PRNP) polymorphisms in healthy Morada Nova sheep reveals the presence of genotypes susceptible to scrapie. **Ciência Animal**, v. 17, p. 27-36, 2007.
- PAIM, T.P.; MCMANUS, C.; VIEIRA, F.D.; et al. Validation of a customized subset of SNPs for sheep breed assignment in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. e00506, 2019.
- PAIVA, S.R. et al. Desenvolvimento e validação de um painel de baixa densidade de marcadores SNP relacionado a prolificidade em ovinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 4., 2016, Curitiba.
- PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; SALOMÃO, A. N.; et al. (Ed.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019, p. 109-129.

- PAL, A & Chakravarty, A.K. Breeding strategies for the development of a disease-resistant stock of livestock. **Genetics and Breeding for Disease Resistance of Livestock**, p. 271-296, 2020.
- PASSOS, D.T.; RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUES, N.C.; et al. PrP polymorphisms in **Brazilian sheep**. **Small Rumin. Res.**, v. 74, p. 130-133, 2008.
- PEREIRA, A.H.R.; et al. Influência da falha na descida testicular e ausência de chifres sobre os pesos ao nascer e ao desmame e sobre o ganho de peso de cordeiros Morada Nova. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 3., 2018, Fortaleza.
- PETERHANS, E., et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Vet Res.** v. 35, n. 3, p. 257-74, 2004.
- PRUSINER, S.B. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 95, n. 23, p. 13363-13383, 1998.
- REGO NETO, A.A. et al. Estrutura e distribuição geográfica do rebanho de ovinos Santa Inês no estado do Piauí. **Revista Brasileira de Saúde e Produção**, v. 15, n. 2, p. 272-280, 2014.
- SANDENBERGH, L. et al. Evaluation of the OvineSNP50 chip for use in four South African sheep breeds. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 46, n. 1, p. 89-93, 2016.
- SEARLE, A.G. Comparative Genetics of Coat Colour in mammals, **Logos Press**, London, UK, 1968.
- SEJIAN, V. et al. Genes for resilience to heat stress in small ruminants: A review. **Small Ruminant Research**, v. 173, p. 42-53, 2019.
- SEO, J. et al. Development and application of indica-japonica SNP assays using the Fluidigm platform for rice genetic analysis and molecular breeding. **Molecular Breeding**, v. 40, n. 4, 2020.
- SILVA, A. P. C. et al. Dermatosparaxis in two White Doper lambs in Brazil: case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 741-746, 2015.
- SILVA, A.S.P. et al. Ovinocultura do Rio Grande do Sul: descrição do sistema produtivo e dos principais aspectos sanitários e reprodutivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1453-1458, dez., 2013.
- SILVA, B. D. M. et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 89-92, 2011.
- THOMPSON, K.G.; BLAIR, H.T.; LINNEY, L.E.; et al. Inherited chondrodysplasia in Texel sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, p. 208-212, 2005.
- THOMSON, M. J. High-Throughput SNP Genotyping to Accelerate Crop Improvement. **Plant Breeding and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 195-212, 2014.
- TINO, C.R.S. et al. Análise da estrutura populacional de ovinos deslanados do núcleo de

- conservação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.2, p.560-564, 2020.
- TORTEREAU, F. et al. Development of a SNP panel dedicated to parentage assignment in French sheep populations. **BMC Genetics**, v. 18 art.50, 2017.
- TURCHETTO-ZOLET, C. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações** /Andreia Carina Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 181 p., 2017.
- VAGE, D.I.; et al. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 39.43, 1999.
- VAN SAUN, R. J. Vitamin D-responsive rickets in neonatal lambs. **Can. Vet. J.**, v. 45, p. 841–844, 2004.
- VILLELA, L. C. V. Ovinos de corte. Embrapa Caprinos e Ovinos, 2021. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/html. Acesso em 07/04/2023.
- WHITE, S.N.; MOUSEL, M.R.; REYNOLDS, J.O.; et al. Deletion variant near ZNF389 is associated with control of ovine lentivirus in multiple sheep flocks. **Anim. Genet.** v. 45, p. 297–300, 2014.
- ZHAO, X.; DITTMER, K.E.; BLAIR, H.T.; et al. 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, p. 6, 2011.
- ZHAO, X.; ONTERU, S.K.; Piripi, S.; et al. In a shake of a lamb's tail: using genomics to unravel a cause of chondrodysplasia in Texel sheep. **Anim Genet.**, v. 43, n. 1, p. 9-18, 2012.
- ZHOU, H.; HICKFORD, J.G.; FANG, Q. A premature stop codon in the ADAMTS2 gene is likely to be responsible for dermatosparaxis in Dorper sheep. **Anim Genet**, v. 43, p. 471-3, 2012.

CAPÍTULO 2

SUSCEPTIBILIDADE AO LENTIVÍRUS EM OVINOS BRASILEIROS E AMERICANOS COM MUTAÇÕES NO GENE *TMEM154*

RESUMO

SUSCEPTIBILIDADE AO LENTIVÍRUS EM OVINOS BRASILEIROS E AMERICANOS COM MUTAÇÕES NO GENE *TMEM154*

Camila Souza Rodrigues ¹, Danielle Assis de Faria ¹, Thaísa Sant’Anna Lacerda ¹, Samuel Rezende Paiva ², Alexandre Rodrigues Caetano ², Harvey Blackburn ³ and Concepta McManus ⁴

1 Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Instituto Central de Ciências, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte, Brasília 70910-900, DF

2 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Final W5 Norte, Brasília 70770-917, DF

3 USDA-ARS—Agricultural Genetic Resources Preservation Research, 1111 South Mason Street, Fort Collins, CO 805214500, USA

4 Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte, Brasília 70910-900, DF

Os lentivírus de pequenos ruminantes (SRLVs) afetam ovinos e caprinos em todo o mundo. O principal gene relacionado às infecções por SRLV é o *Transmembrane Protein Gene 154* (TMEM154). Nós estimamos as frequências haplotípicas do TMEM154 nos bancos genéticos dos EUA (USDA-ARS) e do Brasil (Embrapa) usando duas metodologias diferentes de genotipagem de SNPs, Fluidigm™ e KASP™. Além disso, a variante *ZNF389_ss748775100* também foi genotipada nos rebanhos brasileiros. Um total de 1040 amostras de sangue e 112

amostras de sêmen de 15 raças brasileiras foram genotipadas com Fluidigm para o SNP *ZNF389_ss748775100* e para 12 SNPs *TMEM154*. Um total de 484 amostras de sangue da raça Santa Inês e 188 amostras de sêmen de 14 raças ovinas norte-americanas foram genotipadas com KASP para 6 SNPs *TMEM154*. Todas as amostras brasileiras apresentaram o genótipo “I/I” para a mutação *ZNF389_ss748775100*. Encontramos 25 haplótipos *TMEM154* distribuídos nas raças brasileiras e 4 haplótipos nas raças americanas. Haplótipos associados à susceptibilidade estão presentes em quase todas as raças, o que sugere que a avaliação genética pode ajudar a melhorar a saúde e a produtividade dos rebanhos ao selecionar animais não susceptíveis como fundadores das próximas gerações. Fluidigm e KASP são ensaios confiáveis quando comparados com os Beadchips. Outros estudos são necessários para entender o papel desconhecido das mutações *TMEM154*, além da interação hospedeiro-patógeno e dos novos genes associados à condição clínica.

Palavras-chave: SNPs, *Ovis aries*, maedi-visna, Fluidigm, KASP

ABSTRACT

LENTIVIRUS SUSCEPTIBILITY IN BRAZILIAN AND US SHEEP WITH *TMEM154* MUTATIONS

Camila Souza Rodrigues ¹, Danielle Assis de Faria ¹, Thaísa Sant’Anna Lacerda ¹,
Samuel Rezende Paiva ², Alexandre Rodrigues Caetano ², Harvey Blackburn ³ and
Concepta McManus ⁴

1 Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Instituto Central de Ciências,
Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte, Brasília 70910-900, DF

2 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Final W5 Norte, Brasília 70770-917, DF

3 USDA-ARS—Agricultural Genetic Resources Preservation Research, 1111 South
Mason Street, Fort Collins, CO 805214500, USA

4 Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Campus Darcy Ribeiro,
Universidade de Brasília, Asa Norte, Brasília 70910-900, DF

Small ruminant lentiviruses (SRLVs) affect sheep and goats worldwide. The major gene related to SRLV infections is the Transmembrane Protein Gene 154 (TMEM154). We estimated the haplotype frequencies of TMEM154 in the USA (USDA-ARS) and Brazil (Embrapa) Gene Banks by using two different SNP genotyping methodologies, FluidigmTM and KASPTM. We also genotyped the *ZNF389_ss748775100* deletion variant in Brazilian flocks. A total of 1040 blood samples and 112 semen samples from 15 Brazilian breeds were genotyped with Fluidigm for the SNP *ZNF389_ss748775100*

and 12 TMEM154 SNPs. A total of 484 blood samples from the Santa Inês breed and 188 semen samples from 14 North American sheep breeds were genotyped with KASP for 6 TMEM154 SNPs. All the Brazilian samples had the “I/I” genotype for the *ZNF389_rs748775100* mutation. There were 25 TMEM154 haplotypes distributed across the Brazilian breeds, and 4 haplotypes in the US breeds. Haplotypes associated with susceptibility were present in almost all breeds, which suggests that genetic testing can help to improve herd health and productivity by selecting non-susceptible animals as founders of the next generations. Fluidigm and KASP are reliable assays when compared with Beadchip arrays. Further studies are necessary to understand the unknown role of TMEM154 mutations, host–pathogen interaction and new genes associated with the clinical condition.

Keywords: SNPs, *Ovis aries*, maedi-visna, Fluidigm, KASP

1. INTRODUCTION

Maedi-visna virus (MVV) and caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) are small ruminant lentiviruses (SRLVs) that belong to the genus *Lentivirus* in the *Retroviridae* family. They are distributed worldwide, causing significant economic losses in many countries (Kalogianni et al., 2020). Infections in sheep include interstitial pneumonia with dyspnea, indurative mastitis and cachexia, persisting for the lifetime of the host and causing chronic inflammation (Clawson et al., 2015). Seroconversion in MVV-infected sheep occurs over weeks to months, and, such as other diseases caused by lentiviruses, no effective treatment or vaccine is available (Dohoo et al., 1987). Infected animals show progressive weight loss, low milk yield and a reduced production rate that can lead to premature culling (Keen et al., 1997).

Iceland was successful in ridding local sheep breeds of maedi-visna (MV) or Ovine Progressive Pneumonia (OPP) after an effort that lasted more than three decades (Pétursson et al., 1995). There are no reports of MVV in Australia or New Zealand, despite problems with CAEV in goats from both countries (Greenwood et al., 1995; Motha et al., 1994). Within the UK, MV has reduced lamb production by up to 40% in commercial flocks, whereas in the United States, studies have shown that nearly a quarter of the sheep herd is infected with the disease (Benavides et al., 2013; USDA, 2003). In Brazil, the condition is widespread in most of the states investigated, affecting flocks from the northeast (Da Costa et al., 2007; Souza et al., 2007; Alves et al., 2018; Martinez et al., 2011) to the southeast region of the country (Fernandes et al., 2011; Dorneles et al., 2020; Lombardi et al., 2009; Barioni et al., 2009).

Previous studies reported the occurrence of multiple candidate loci associated with a resistance/susceptibility to MV, such as ZNF389 (White et al., 2014), CCR5 (White et al., 2009), TLR9 (Sarafidou et al., 2013), ovar-DRB1 (Hermann-Hoesing et al., 2008; Larruskain et al., 2010), DPPA2/DPPA4 and SYTL3 (White et al., 2010). A previous study

has reported that breed-specific differences can influence a higher or lower susceptibility to lentiviruses in small ruminants (Cutlip et al., 1986). In a Genome-wide association study (GWAS), the deletion variant of ZNF389 was linked with the proviral concentration of ovine Lentivirus (OvLV) found in some of the most common sheep breeds of the US (White et al., 2012). Subsequently, another study indicated that insertion homozygotes had less than half the adjusted mean proviral concentration when compared with other genotypes (White et al., 2014).

Heaton et al. (2012) identified a major gene related to OPP susceptibility, the transmembrane protein gene 154 (TMEM154). According to the authors, animals that have the ancestral haplotype (designated haplotype 3), which encodes glutamate (E) at position 35 and asparagine (N) at position 70, and the designated haplotype 2, which encodes isoleucine (I) at position 70 of the TMEM protein, are highly susceptible to MV. Conversely, those with haplotype 1, homozygous for the mutation encoding lysine (K) at position 35, are considered less susceptible to the infection.

After identifying the positive association between TMEM154 and lentivirus susceptibility, a linkage disequilibrium (LD) between TMEM154_E35K locus and SNP OAR17_5388531 (Illumina® Ovine SNP50 Beadchip) was observed (Heaton et al., 2013). The LD between these two loci assign that the allele “C” at SNP OAR17_5388531 is associated with a higher susceptibility to the infection. Other papers confirmed this association in sheep from Turkey (Yaman et al., 2019), Germany (Molaei et al., 2018), Iran (Molaei et al., 2019) and Spain (Ramírez et al., 2021).

Although a link between the effects of TMEM154 on MV is often reported, the role of some TMEM154 mutations needs to be further investigated. Additionally, other studies are necessary to fully understand the impact of other co-receptors in the occurrence of the disease. The use of TMEM154 as a proxy can make the genomic selection of animals with favorable haplotypes possible and help reduce the economic losses caused by MV (Heaton et al., 2013).

The selection of animals with favorable haplotypes can also improve the quality of germplasm (e.g., semen and embryos) stored at gene banks. Ex situ collections, such as the Brazilian Animal Germplasm Biobank (BBGA) and the American germplasm collection managed by the US National Germplasm Program (NAGP), are valuable tools that, allied with in situ conservation, can help in the conservation of Animal Genetic Resources (Paiva et al., 2016). Therefore, genotyping samples kept at gene banks are crucial to guarantee the genetic variability of the material. This can be an important strategy to optimize the

quality of the material stored and ensure that genetic variability is maintained (Zomerdijk et al., 2020).

This study aimed at estimating the haplotype frequencies of the TMEM154 gene and genotyping the ZNF389_ss748775100 deletion, related to lentivirus susceptibility, in the USA (USDA-ARS) and Brazil (Embrapa) animal genetic resources gene banks by using two different SNP genotyping methodologies, FluidigmTM and KASPTM.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animal Samples

The present study used 1040 blood samples from the sheep of 15 breeds, kept in conservation centers of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) distributed across the country. The main criteria for sample selection were the biological material and breed availability in National Gene Bank and the Embrapa Conservation Nucleus. Within breeds, the criterion was regional sampling. The breeds used in the study were: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Brazilian Somali, Brazilian Bergamasca, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel and Barriga Negra. Semen samples (N = 112) from these breeds kept at the Brazilian Animal Germplasm Biobank (BBGA) were also included in the study (Table 1). Additionally, we used 484 blood samples spotted on the FTA (Flinders Technology Associates) cards of the Santa Inês breed, belonging to a herd kept by a Conservation Nuclei at Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC) and, finally, 188 animal samples of 14 North American breeds: Barbados Blackbelly, Black Welsh Mountain, Bluefaced Leicester, Hampshire, Hog Island, Katahdin, Leicester Longwool, Lincoln, Navajo Churro, Polypay, Rambouillet, Romanov, St. Croix and Suffolk kept at the National Center for Genetic Resources Preservation (NCGRP) (Table 1).

Table 1. Methodology and number of samples used in the present study according to sheep breed and country of origin.

Breed/Group Code	Breed/Group	Country	N	Genotyping Methodology
	Brazilian Animal Germplasm			
BBGA	Biobank	Brazil	88	Fluidigm
BBN	Brazilian Barriga Negra	Brazil	43	Fluidigm
BBA	Brazilian Bergamasca	Brazil	39	Fluidigm
BCR	Brazilian Corriedale	Brazil	29	Fluidigm
BCL	Brazilian Crioula Lanada	Brazil	44	Fluidigm
BDAM	Brazilian Damara	Brazil	10	Fluidigm
BDOR	Brazilian Dorper	Brazil	18	Fluidigm
BHA	Brazilian Hampshire	Brazil	14	Fluidigm
BIF	Brazilian Ile de France	Brazil	39	Fluidigm
BMN	Brazilian Morada Nova	Brazil	129	Fluidigm
BPT	Brazilian Pantaneiro	Brazil	46	Fluidigm
BRL	Brazilian Rabo Largo	Brazil	34	Fluidigm
BSI	Brazilian Santa Inês	Brazil	233	Fluidigm
BSO	Brazilian Somali	Brazil	37	Fluidigm
BSUF	Brazilian Suffolk	Brazil	28	Fluidigm
BTEX	Brazilian Texel	Brazil	14	Fluidigm
BSI	Brazilian Santa Inês-CPATC	Brazil	484	KASP
BB	Barbados Blackbelly	USA	10	KASP
BW	Black Welsh Mountain	USA	20	KASP
BL	Bluefaced Leicester	USA	1	KASP

HA	Hampshire	USA	8	KASP
HI	Hog Island	USA	1	KASP
KT	Katahdin	USA	1	KASP
LL	Leicester Longwool	USA	2	KASP
LI	Lincoln	USA	8	KASP
NA	Navajo Churro	USA	17	KASP
PO	Polypay	USA	17	KASP
RA	Rambouillet	USA	70	KASP
RN	Romanov	USA	8	KASP
SC	St. Croix	USA	23	KASP
SUF	Suffolk	USA	2	KASP

Semen samples were acquired from artificial insemination centers either by the American National Animal Germplasm Program or Brazilian Animal Germplasm Network as an effort to conserve genetic resources.

DNA extraction was performed using the Puregene purification protocol (Genra Puregene® Kit, QIAGEN, USA) for blood and semen samples. The DNA of the blood spotted FTATM cards was extracted using the GenSolve™ DNA Recovery Kit (GenTegra, USA) according to the manufacturer's instructions. A DNA quality check of the Brazilian sheep samples was performed in two ways. Initially, 1% agarose gel was used, stained with ethidium bromide, using lambda standards of 200 ng/μg, 100 ng/μg and 50 ng/μg for comparison. In addition, the samples were analyzed in a NanoDrop Thermo Scientific spectrophotometer (NanoDrop™ 8000. Thermo Fisher Scientific, 2010. <https://www.thermofisher.com/> accessed on 12 July 2015). The DNA obtained from the North American sheep was quantified by spectrophotometry only.

2.2. Genotyping Methodologies

We used two genotyping methodologies in the present study: KASP™ (LGC Genomics, Hoddesdon, UK) and Fluidigm EP1™ system (Fluidigm, San Francisco, CA, USA). After a

quality and quantity check, 90 µg of DNA was used for genotyping the Brazilian breeds, except for the Santa Inês samples from the CPATC. Genotyping data were generated according to standard protocols provided by Fluidigm for use with an EP1 platform. Each sample underwent pre-amplification with a set of Locus-Specific Primer (LSP) and Specific Target Amplification (STA) oligonucleotides for the assayed SNPs. Diluted amplified product was loaded into twelve 96.96 Dynamic Array™ IFCs (Fluidigm, San Francisco, CA, USA) with a ROX reference dye and the assays containing the Allele-Specific Primers (ASP) and LSP oligonucleotides for each SNP, according to the manufacturer's instructions at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Brasilia, Brazil). ASP, LSP and STA sequences are available in Table S1. Briefly, Fluidigm® SNP Type™ assays were designed for 12 selected SNPs with a Fluidigm D3™ assay web-based tool, according to the manufacturer's instructions and rules described at [<https://d3.fluidigm.com/account/login> accessed on 12 July 2015]. Endpoint fluorescence image data were acquired on the EP1 Fluidigm imager, and the genotype calls were obtained by the Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software.

The North American breeds and the Santa Inês samples from the CPATC were genotyped by KASP, using 10 ng of DNA per sample in a 96-well plate format. The reaction and the components used in the KASP methodology are described at [<http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/> accessed on 12 July 2015]. Oligonucleotides were designed with the Kraken™ software system according to the manufacturer's instructions (LGC Genomics, Hoddesdon, UK).

The SNPs OAR17_5388531 (rs414338245), TMEM154_N70I (rs427737740), TMEM154_E35K (rs408593969), TMEM154_I102T, TMEM154_A13V-F12 and TMEM154_T25I were genotyped by both the KASP and Fluidigm methodologies. The SNP ZNF389_ss748775100 and SNPs TMEM154_D33N (rs429882112), TMEM154_E31Q_v2, TMEM154_I74F (rs410216979), TMEM154_L14H, TMEM154_T44M (rs420489630) and TMEM154_E84Y were genotyped only by the Fluidigm methodology. The ZNF389 deletion variant NC_019477.1: g.29500068_2 9500069delAT ovine chromosome 20, NCBI dbSNP ss748775100) was genotyped with amplification primers, designed according to White et al. (2014) and observing the specific rules of the Fluidigm assay. The flanking sequences of the TMEM154 SNPs were designed according to Heaton et al. (2013), observing each methodology's rules.

Genotypes from the locus OAR17_5388531 within Illumina® Ovine SNP50 and Illumina® Ovine 600K were used to determine genotype reproducibility among methodologies. We were able to access 14 and 7 common animals between Fluidigm and

Illumina® Ovine SNP50 and Illumina® Ovine 600K, respectively (Table S2). Furthermore, 7 and 14 samples were used to compare KASP and Illumina® Ovine SNP50 and Illumina® Ovine 600K, respectively (Table S3). Additionally, the locus TMEM154_E35K was accessed in 10 common animals between Fluidigm and Illumina® Ovine 600K BeadChip (Table S4). Finally, to compare both methodologies used in this study, we used 3 SNPs (TMEM154_E35K, TMEM154_N70I and TMEM154_I102T) in 27 samples (Table S5). The Friedman test (Friedman, 1937) was applied to determine whether the differences in the genotypes across the methodologies were statistically significant.

2.3. Data Analysis

Clustering was used to define the genotype classes for each SNP for both methods and was processed using GenomeStudio (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). The confidence threshold for each genotype was >0.90 for both methodologies. Samples, in batches of 96, underwent quality control using SNP & Variation Suite v8.9.1—SVS (Golden Helix, Bozeman, MT, www.goldenhelix.com accessed on 15 November 2019), eliminating samples with a call rate < 0.80 and markers with a call rate < 0.75 . The linkage disequilibrium (LD) between the TMEM154_E35K and OAR17_5388531 SNPs using r^2 statistics was also estimated using SVS v 8.9.1 (Golden Helix, Bozeman, MT, USA) (Heaton et al., 2013). Allele and haplotype frequencies were estimated by GenAIEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) and Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Monomorphic SNPs were not included in the haplotype analysis. Chi-square test ($p < 0.05$) (Pearson, 1900) was performed to determine whether the differences in allele frequencies across populations of the Santa Inês breed were statistically significant (Table S6).

3. RESULTS

3.1. Quality Control and Linkage Disequilibrium (LD)

All SNPs and samples passed the quality control filters for the KASP methodology. From the 6 SNPs genotyped, 3 were monomorphic in all breeds (TMEM154_I102T, TMEM154_A13V and TMEM154_T25I). After the quality control of the Fluidigm methodology, 845 samples with a call rate >0.80 remained from the 1152 genotyped. The SNPs OAR17_5388531, TMEM154_A13V-F12, TMEM154_D33N, TMEM154_E31Q_v2, TMEM154_E35K, TMEM154_I74F, TMEM154_N70I, TMEM154_T44M and TMEM154_E84Y successfully passed quality control. The SNPs (TMEM154_L14H and TMEM154_T25I) with a call rate <0.75 were excluded from the analysis. The SNP TMEM154_I102T was monomorphic, presenting the allele “T” in all breeds genotyped and was not included in the haplotype analysis. The locus ZNF389_ss748775100 was also monomorphic in all populations genotyped in this study, with all breeds homozygous for the “I/I” genotype. The r^2 measure between the TMEM154_E35K and OAR17_5388531 alleles across all populations were 0.96 and 0.93 on Fluidigm and KASP, respectively, indicating a strong LD between the allele “C” of the locus OAR17_5388531 and the allele “G” of the SNP TMEM154_E35K.

3.2. Allele Frequency of Locus OAR17_5388531 in Brazilian and North American Sheep

The frequency of the “C” allele of the SNP OAR17_5388531 ranged from 0.0% in the Hog Island breed to 100% in the Katahdin and Damara breeds (Figure 1). Breeds with a higher frequency of the “C” allele have higher frequencies of TMEM154 E35 (highly

susceptible haplotypes 2 and 3) and, consequently, are animals that are more prone to develop the disease. Alternatively, breeds with a low frequency of the C allele have a higher frequency of TMEM154 K35 (less-susceptible haplotype 1), and, therefore, are animals that are less susceptible to OPP.

3.3. Distribution of TMEM154 Haplotypes in Brazilian and North American Sheep

The nine SNPs in the TMEM154 gene (OAR17_5388531, TMEM154_A13V-FI2, TMEM154_D33N, TMEM154_E31Q_v2, TMEM154_E35K, TMEM154_I74F, TMEM154_N70I, TMEM154_T44M and TMEM154_E84Y) generated 25 different haplotypes for the Brazilian sheep. The populations with the highest and lowest number of haplotypes were the BBGA and Damara, with 12 and 1, respectively. Among these haplotypes, the most common was “AQNETNFEI” (highly susceptible) (20%), occurring in 13 of the 16 breeds, followed by “AQDKTNFEI” (susceptible) (16%), which occurred in 13 breeds. The rarest haplotypes were “AQNETIFYΔI” (3%), found only in the Dorper breed, followed by “AQDKMNFIEI” and AQNEMIIIEI”, both with a 1% frequency in the BBGA samples. Other rare haplotypes were “AQDEMNFIEI” and “AQNKMNFIEI”, with a 1% frequency and present only in the Brazilian Bergamasca breed. Furthermore, the haplotypes “AQNETNIYΔI” (1%) and “AQNEMNIYΔI” (1%) were unique to the Pantaneiro sheep. Finally, the haplotype “AQDKTIFYΔI” (1%) was detected only in the Rabo Largo breed, and the haplotypes “AQDETNIIEI” (1%) and “AQDETIIEI” (1%), were exclusive to the Santa Inês (Table 2).

The 6 SNPs genotyped with the KASP methodology (OAR17_5388531, TMEM154_N70I, TMEM154_E35K, TMEM154_I102T, TMEM154_A13V and TMEM154_T25I) generated 4 haplotypes among the US breeds and the Santa Inês from the Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC) (Table 3). The most common haplotype found was “KNIT” (less susceptible) (30%), present in 13 populations out of the 15 populations analyzed in this study, followed by “ENIT” (highly susceptible) (9%), present in 11 populations. The less common haplotype was “KIIT” (less susceptible) (3%), found only in the Bluefaced Leicester and Hampshire.

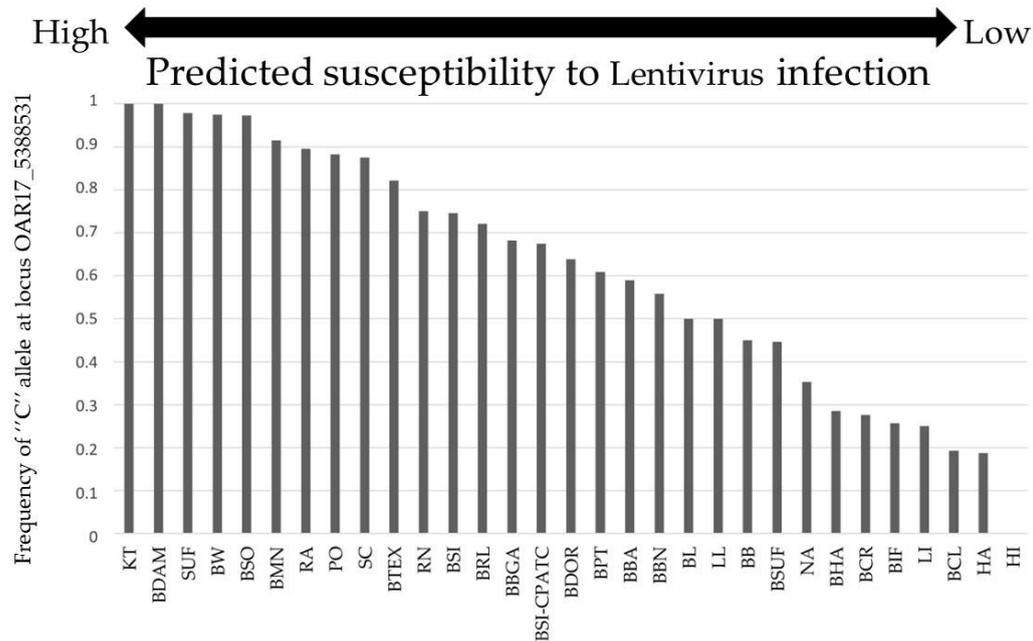


Figure 1. Frequency of the allele “C” at the locus OAR17_5388531 in Brazilian and North American sheep breeds. The “C” allele is in LD with the “G” allele in the codon 35 (GAA) of the TMEM154 gene. KT—Katahdin; BDAM—Brazilian Damara; SUF—Suffolk; BW—Black Welsh Mountain; BSO—Brazilian Somali; BMN—Brazilian Morada Nova; RA—Rambouillet; PO—Polypay; SC—St. Croix; BTEX—Brazilian Texel; RN—Romanov; BSI—Brazilian Santa Inês; BRL—Brazilian Rabo Largo; BBGA—Brazilian Animal Germplasm Biobank; BSI-CPATC – Brazilian Santa Inês-CPATC; BDOR—Brazilian Dorper; BPT—Brazilian Pantaneiro; BBA—Brazilian Bergamasca; BBN—Brazilian Barriga Negra; BL—Bluefaced Leicester; LL—Leicester Longwool; BB—Barbados Blackbelly; BSUF—Brazilian Suffolk; NA—Navajo Churro; BHA—Brazilian Hampshire; BCR—Brazilian Corriedale; BIF—Brazilian Ile de France; LI—Lincoln; BCL—Brazilian Crioula Lanada; HA—Hampshire; HI—Hog Island.

Table 2. TMEM154 haplotype frequencies of Brazilian sheep generated by 9 SNPs with the Fluidigm methodology.

Breed/Group ¹	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	Missing Data	
BBGA	0.17	0.063	0.011	0.011	0.33	0.119	0.091	0.011	0.017	0.011	0.006	0.011														0.148	
BBN	0.163	0.14			0.209	0.163	0.058	0.023	0.023				0.012	0.093													0.116
BBA	0.028	0.216			0.088	0.13		0.115							0.038	0.013	0.013	0.026									0.333
BCR	0.247	0.424			0.01	0.128		0.034		0.034																	0.122
BCL	0.591	0.034			0.034		0.102	0.011																			0.227
BDAM						0.8																					0.2
BDOR		0.222				0.278		0.111										0.028	0.028								0.333
BHA	0.07	0.25	0.071		0.04				0.04	0.04																	0.489
BIF	0.06	0.244				0.103		0.026							0.026												0.543
BMN	0.03	0.007			0.786	0.008	0.039						0.023														0.106
BPT	0.391				0.315		0.087		0.12												0.011	0.011					0.065
BRL	0.147	0.115			0.103	0.252		0.027															0.011				0.344
BSI	0.115	0.029			0.21	0.076	0.173	0.057			0.006	0.011		0.018										0.008	0.008		0.29
BSO					0.014	0.473	0.014	0.162											0.014								0.324
BSUF	0.357	0.25	0.036			0.054		0.089		0.054								0.018									0.143
BTEX		0.143				0.107		0.107		0.036								0.036									0.571

¹ Breeds/Groups: BBGA—Brazilian Animal Germplasm Biobank; BBN—Brazilian Barriga Negra; BBA—Brazilian Bergamasca; BCR—Brazilian Corriedale; BCL—Brazilian Crioula Lanada; BDAM—Brazilian Damara; BDOR—Brazilian Dorper; BHA—Brazilian Hampshire; BIF—Brazilian Ile de France; BMN—Brazilian Morada Nova; BPT—Brazilian Pantaneiro; BRL—Brazilian Rabo Largo; BSI—Brazilian Santa Inês; BSO—Brazilian Somali; BSUF—Brazilian Suffolk; BTEX—Brazilian Texel. ² Haplogroups: H1 – AQDKTNIEI; H2 – AQDKTNFEI; H3 – AQDKMNIEI; H4 – AQDKMNFEI; H5 – AQNETNIEI; H6 – AQNETNFEI; H7 – AQNETIIEI; H8 – AQNETIFEI; H9 – AQNEMNIEI; H10 – AQNEMNFEI; H11 – AQNEMIEI; H12 – VQNETNIEI; H13 – AQDKTIEI; H14 – AQNKTNIEI; H15 – AQDKTIFEI; H16 – AQDEMNFIEI; H17 – AQNKMNFEI; H18 – AQNEMIFEI; H19 – AQNETNFYΔI – H20 – AQNETIFYΔI; H21 – AQNETNIYΔI; H22 – AQNEMNIYΔI; H23 – AQDKTIFYΔI; H24 – AQDETNIIEI; H25 – AQDETIEI.

Table 3. *TMEM154* haplotype frequencies of North American breeds and Brazilian Santa Inês generated by 6 SNPs with the KASP methodology.

Breed ¹	H1 ²	H2	H3	H4
BB	0.900	0.100		
BW	0.600	0.200	0.200	
BL		0.500		0.500
HA	0.125		0.625	0.250
HI	1.000			
KT	1.000			
LL	1.000			
LI	1.000			
NA	0.852	0.058	0.088	
PO	0.970	0.029		
RA	0.602	0.191	0.191	
RN		1.000		
SC	0.562	0.125	0.187	
SUF	0.608	0.086	0.304	
BSI (CPATC)	0.149	0.518	0.275	

¹ Breeds: BB—Barbados Blackbelly; BW—Black Welsh Mountain; BL—Bluefaced Leicester; HA—Hampshire; HI—Hog Island; KT—Katahdin; LL—Leicester Longwool; LI—Lincoln; NA—Navajo Churro; PO—Polypay; RA—Rambouillet; RN—Romanov; SC—St. Croix; SUF—Suffolk; BSI—Brazilian Santa Inês (CPATC). ² Haplogroups: H1—K N I T; H2—E N I T; H3—E I I T; H4—K I I T.

3.4. Data Comparison among Genotyping Platforms

The locus OAR17_5388531 was genotyped on 14 common animals on both Fluidigm and Illumina® Ovine SNP50. The reproducibility of the genotypes between methodologies was 100% (Table S2), with all 28 alleles identical. The same result was obtained when we compared seven animals genotyped with Illumina® Ovine 600K BeadChip and Fluidigm (Table S2). Another locus between Illumina® Ovine 600K BeadChip and Fluidigm was used to compare the repeatability of the genotypes between 10 common animals (TMEM154_E35K), and, once again, a total of 20 alleles were the same between the methodologies (Table S4).

Regarding KASP and Illumina® Ovine SNP50, we used seven samples and the locus OAR17_5388531 as a reference. The results were the same as above, with a repeatability of 100% for the 14 alleles. For the same locus, using Illumina® Ovine 600K BeadChip and 14 samples (Table S3), 28 alleles were identical.

Finally, comparing the two genotyping methodologies used here, KASP and Fluidigm, 27 common animals and 3 loci were analyzed: TMEM154_E35K,

TMEM154_N70I and TMEM154_I102T (Table S5). Following the pattern found in the previous analysis, the comparison between Fluidigm and KASP points to a repeatability of 100% on all 3 loci genotyped, as all 54 alleles were identical in the 27 common animals genotyped by both methodologies.

3.5. Differences in Allele Frequencies among Santa Inês Populations

For some loci, a difference in the allele frequency was observed according to the geographic region of origin of the Santa Inês flock. The TMEM154_N70I locus have, in general, the allele “A” as the most frequent allele. However, the Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA-BA) and the Embrapa Meio Norte-PI (CPAMN) populations have “T” as their highest frequency allele with frequencies of 0.75 and 0.63, respectively (χ^2 , $p > 0.05$) (Table S6). Similar patterns occur for the locus TMEM154_I74F where the BBGA, CNPC and CPATC have the allele “A” as the most frequent. On the other hand, the UnB-DF and CPAMN presented the allele “T” as the most frequent (χ^2 , $p < 0.05$). Furthermore, the EBDA-BA has a frequency of 0.5 for each allele. For some loci, e.g., TMEM154_A13V-FI2 and TMEM154_E31Q_v2, we observed rare alleles with low frequencies in single populations: the CNPC (0.02, allele “T”) and CPAMN (0.04, allele “C”), respectively (Table S6). Ultimately, the locus TMEM154_D33N has frequencies around 0.15 for the allele “G” in most Santa Inês populations (Table S6). Still, for the UnB-DF and CNPC, the frequencies were 0.44 and 0.33, respectively (χ^2 , $p < 0.05$).

4. DISCUSSION

The KASP method was 100% successful, as all designed SNPs were converted into primers and genotyped, and none of the SNPs or samples were eliminated by call rate in this methodology. For the Fluidigm methodology, we designed 13 assays and performed 12 different runs with 96.96 plates, in which each run must be considered a separate event. Analysis of the entire dataset resulted in the elimination of 2 of the 13 SNPs (TMEM154_L14H and TMEM154_T25I) as they showed call rates 0.90, increasing the accuracy of the results. It is important to mention that the SNP TMEM154_I102T was monomorphic in all breeds genotyped across both methodologies.

The results from Fluidigm and KASP matched 100% with the results from the 50k and HD panels. Additionally, we did not find any differences in the genotypes between the two methodologies, indicating that both Fluidigm and KASP can be reliable alternatives for fast, customized and cost-effective genotyping. Furthermore, it is important to reinforce that the KASP methodology was 100% successful, with no samples or loci eliminated by call rate. However, samples and markers eliminated by call rate (<0.75) in the Fluidigm methodology can be explained by the higher *confidence threshold*, and each 96.96 plate genotyped represents a different PCR reaction, considered an independent genotyping event.

Haplotypes encoding (E) glutamate at position 35 of TMEM154 are considered highly susceptible to OPP. In contrast, haplotypes encoding (K) lysine at the same position are considered less susceptible (Heaton et al., 2012). The high LD we found between the loci OAR17_5388531 and TMEM154_E35K was expected and is in accordance with the results obtained by a previous study (Heaton et al., 2013). Mainly, we observed a higher frequency of the allele “C” in the breeds genotyped in this study. The highest frequency (100%) was found in the Damara, and the lowest (0.19%) in the Crioula Lanada. The Santa Inês breed is raised across Brazil. Nevertheless, we did not observe a difference in the allele frequencies for the

locus OAR17_5388531 among the populations, with a high frequency of the “C” allele in all populations analyzed. A high value of r^2 indicates that the SNP OAR17_5388531 can estimate highly susceptible TMEM154 alleles in all the studied populations. OAR17_5388531 can be used as a surrogate to relate the “C” allele with susceptibility, easing the genotyping process for breeders that have already performed it using Illumina® Ovine SNP50 BeadChip or Illumina® Ovine 600K BeadChip. Breed populations with a lower occurrence of the “C” allele are predicted to have a higher frequency of K35 animals, which is associated with a lower susceptibility to the disease (Heaton et al., 2013).

It is expected that distinct Santa Inês populations within the county present differences in allele frequencies, as demonstrated by previous authors with neutral markers (Paiva et al., 2005). The hypotheses can be raised that geographic distances affect the gene flow and level of admixture of the Santa Inês breed within certain populations (Paim et al., 2021; McManus et al., 2020). For example, Santa Inês belonging to the UnB-DF herd seem to be crossbred with Bergamasca. This was proposed previously, where it was observed that Santa Inês animals from the center-west and southwest are genetically closer to Bergamasca than in other regions (Paiva et al., 2005; Paim et al., 2021; McManus et al., 2020; McManus et al., 2010; Carneiro et al., 2010). We did not find any significant allelic frequency differences among the BBGA, CNPC and CPATC Santa Inês populations. Two facts may explain this: (i) the BBGA is composed mainly of samples that come from the CNPC and CPATC flocks and (ii) both flocks are close geographically speaking, so there is an exchange of germplasm material between them. The same result could be expected for the Morada Nova breed. Despite the large number of animals of this breed, these are concentrated in the northeast region of the country (McManus et al., 2019), close to the CNPC conservation nuclei.

It's important to ensure the genetic variability of the germplasm stored in biobanks. Therefore, results such as those found here, where a single population of a breed has a rare allele or differences in allele frequencies, can aid in the long-term conservation of breed diversity and function as an important resource for breeders.

The TMEM154_I102T variant was observed for the first time in the Santa Inês breed, during resequencing by a previous study (Heaton et al., 2013). The authors identified the polymorphism in a single animal as a compound heterozygote for this locus. The animal was also heterozygous for the TMEM154_N70I variant. However, in our study, none of the populations presents heterozygous animals for the TMEM154_I102T locus. The TMEM154_N70I locus in the Santa Inês breed has a frequency of 0.6% for the allele “A” and

0.4% for the allele “T”. For the Santa Inês from the CPATC, the frequency was 0.7% for the allele “A” and 0.3% for the allele “T”, indicating heterozygous animals in the flocks. Overall, the allele “T” of the TMEM154_N70I locus has a total frequency of 5.9% in Brazilian sheep and 23.7% in North American sheep. Heaton et al. (2013) called the variant TMEM154_I102T based on two reads of nine with high-quality scores, but, here, we could not reproduce the rare genotype found by the authors in any of the Brazilian breeds. We used this variant to test the reproducibility and check if this was an exclusive mutation of the Santa Inês breed.

Heaton et al. (2013) defined haplotypes 1 (less susceptible), 2 (susceptible) and 3 (highly susceptible) in the Santa Inês breed. These authors also identified haplotypes 1 and 3 in the Crioula Lanada and Morada Nova breeds, as per the data obtained in the present study. Additionally, haplotype 6, considered rare, was previously observed in the Suffolk breed but not observed in the present study (2013). This might be due to the relatively low sample size used here. This reservation also applies to the following breeds: Bluefaced Leicester, Hog Island, Katahdin and Leicester Longwool, since their sample size is ≤ 2 . Murphy et al. (2021) confirmed that animals with diplotype “1”, “1” of the K35 variant of TMEM154 had a reduced incidence of OPP infection, which leads to an improvement in productivity. Furthermore, the author suggests that the selection of sheep with the TMEM154 haplotype “1” in flocks with a high frequency of haplotype “3”, can be a cost-effective alternative to reduce the economic damage caused by OPP. However, further investigation is required to understand the effect of other TMEM154 mutations on the susceptibility to the disease and whether these effects can be extended to multiple breeds.

SRLVs present high genetic variability, contributing to the evolution of multiple viral strains worldwide (Pasick, 1998). MVV-like and CAEV-like strains of SRLVs were primarily considered strictly host-specific for sheep and goats, respectively. However, recent investigations indicated that cross-species transmission events are possible in sheep and goats from Brazilian mixed flocks (da Cruz et al., 2013; Braz et al., 2022). Ramirez et al. (2021) suggest that selection based on TMEM154 is suitable for specific SRLVs strains and ovine breeds. Nonetheless, the same authors propose that generalization to the whole genetic spectrum of Lentiviruses, ovine breeds and epidemiological situation across the globe may need further validation.

Molae et al. (2019) indicate that the association of the SNP TMEM154_E35K with a susceptibility to the disease must be undertaken carefully as, in the Merinoland breed, a high number of KK (less-susceptible genotype) sheep was positive for SRLV. Therefore,

follow-up breed-specific studies can be useful to detect new TMEM154 variants associated with the development of MV, as well as to understand the unknown role of already identified markers. Furthermore, other genes such as Ovine-DRB1 can be associated with a susceptibility to MV, implying that studies aimed at understanding other genetic factors involved in the occurrence of SRLVs are crucial (Yaman et al., 2021).

White et al. (2014) established an association between the deletion variant ZNF389_ss748775100 and higher proviral concentrations in Rambouillet, Polypay and Columbia sheep from Idaho, US. Conversely, in our study, no breeds genotyped presented the deletion allele, as all populations were homozygous for the insertion “I/I”. According to White et al. (2014), animals with this genotype had less than half the adjusted mean proviral concentrations, which could possibly indicate an association with susceptibility to the virus.

Although ZNF389 has been previously associated with MV, further investigation is required to understand the functional importance of this genomic region. Zinc finger proteins (ZFPs) are characteristic DNA binding domains that can be found in a variety of transcription factors (Laity et al., 2001). White et al. (2014) implicate that ZNF389 plays a biological role related to ovine lentivirus proviral concentration in sheep. The same authors propose that one or more zinc finger genes located in this region can act as a transcriptional regulator of host genes, such as TRIM5a, limiting the proviral replication of the virus (White et al., 2014; Jáuregui et al., 2012).

The results obtained in this study can be of paramount importance for the Brazilian and American gene banks. For instance, investigation of the ZNF389_ss748775100 deletion variant genotypes, the TMEM154 haplotypes and their frequencies in the breeds can help to select animals with favorable alleles and haplotypes. Nevertheless, gene banks should store all genotypes to facilitate future work on susceptibility and resistance. Consequently, these methodologies can be reliable resources for breeders if MV becomes a threat, thus aiding in the conservation of breed diversity.

5. CONCLUSIONS

Overall, haplotypes associated with a lower susceptibility risk to OPP are common in both Brazilian and North American sheep. This suggests an opportunity to reduce Lentivirus susceptibility in multiple sheep breeds using genomic selection. There is a significant difference in the allele frequencies of the TMEM154 mutations among different Santa Inês populations, resulting from the genetic subdivision previously observed in the breed. Contrary to the insertion allele, the ZNF389_ss748775100 deletion variant (associated with higher proviral concentrations in sheep) was not detected in any of the breeds here.

Genetic variability is crucial to ensure the quality of the material stored in conservation centers and gene banks. The results found here of the TMEM154 haplotypes, and their frequency suggest a range of genetic variability has been captured by the gene banks. A few breeds showed a lack of variability, which was likely due to a small sample size. Finally, the comparison of the results obtained from the Fluidigm and KASP assays with more robust technologies, such as the 50k and the HD panels, indicate that these methodologies are reliable. Therefore, they can be useful, cost-effective tools to improve breeding programs. Further validation is still necessary to understand the unknown role of some of the TMEM154 mutations and the role of other genetic factors associated with the disease.

6. REFERENCES

- KALOGIANNI, A. I.; BOSSIS, I.; EKATERINIADOU, L. V.; GELASAKIS, A. I. Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 616, Apr. 2020.
- CLAWSON, M. L. et al. Genetic subgroup of small ruminant lentiviruses that infects sheep homozygous for TMEM154 frameshift deletion mutation A4Δ53. **Veterinary Research**, v. 46, p. 22, 2015.
- DOHOO, I. R. et al. The effects of maedi-visna virus infection on productivity in ewes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 4, p. 471-484, 1987.
- KEEN, J. E. et al. Effect of ewe ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 30, p. 155-169, 1997.
- PÉTURSSON, G. Experience with Visna virus in Iceland. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 724, p. 43-49, 1994.
- GREENWOOD, P. L.; NORTH, R. N.; KIRKLAND, P. D. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 341-345, 1995.
- MOTHA, M. X.; RALSTON, J. C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. **Veterinary Microbiology**, v. 38, p. 359-367, 1994.
- BENAVIDES, J. et al. Impact of maedi-visna in intensively managed dairy sheep. **The Veterinary Journal**, v. 197, p. 607-612, 2013.
- USDA. Ovine Progressive Pneumonia: Awareness, Management, and Seroprevalence; Animal and Plant Health Inspection Service VS, Centers for Epidemiology and Animal Health: **Fort Collins**, CO, USA, 2003.
- DA COSTA, L. S. P. et al. Lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos Santa Inês: isolamento, identificação pela PCR e inquérito sorológico no estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 74, p. 11-16, 2007.
- SOUZA, T.S. et al. Estudo sorológico da Maedi-Visna pelo método de imunodifusão em gel de ágar em rebanhos ovinos de Juazeiro, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção**

Animal, v. 8, n. 4, p. 276-282, 2007.

ALVES, S. M. Seroepidemiological study of maedi-visna in sheep in Ceara, Rio Grande do Norte, Paraíba, and Sergipe States. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 2017-2028, 2018.

MARTINEZ, P.M.; Costa, J.N.; Souza, T.S.; Lima, C.C.V.; Costa Neto, A.O.; Pinheiro, R.R. Serological prevalence of Maedi-Visna in sheep herds in the microregion of Juazeiro, Bahia, Brazil by means of agar gel immunodiffusion test. **Cienc. Anim. Bras.** 2011, 12, 322–329.

FERNANDES, L.G.; Freitas, F.J.C.; Lima, J.M. Ocorrência de caprinos e ovinos soropositivos para lentivírus provenientes de exposições agropecuárias do Rio Grande do Norte. **In Proceedings of the Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Florianópolis, Brazil, 1–4 November 2011.

DORNELES, E. M. S. et al. Seroprevalence of Brucella ovis-epididymitis, smooth-Brucella, leptospirosis, toxoplasmosis, and Maedi-Visna in sheep slaughtered in Minas Gerais State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57, p. e164278, 2020.

LOMBARDI, Ana Luiza; NOGUEIRA, Adriana Helena C.; FERES, Flávio C.; PAULO, Helder P.; CASTRO, Roseane S.; FEITOSA, Flávia L. F.; CADIOLI, Fabiano A.; PEIRÓ, Juliana R.; PERRI, Silvia Helena Venturoli; LIMA, Valéria F. M. Soroprevalência de Maedi-Visna em ovinos na região de Araçatuba, SP. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, p. 1434-1437, 2009.

BARIONI, G.; Pereira, L.V.; Beltrame, M.A.V.; Tesoline, P.; Gumieiro, M.V. (2009). Soroprevalência de Maedi-Visna em ovinos da raça Santa Inês nos municípios da grande Vitória-ES. **Cienc. Anim. Bras.**, 1, 579–584.

WHITE, S.N.; Mousel, M.R.; Reynolds, J.O.; Herrmann-Hoesing, L.M.; Knowles, D.P. Deletion variant near ZNF389 is associated with control of ovine lentivirus in multiple sheep flocks. **Animal Genetics**, 45(2), 297-300, 2014.

WHITE, S. N. et al. Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine CCR5 and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus. **Animal Genetics**, v. 40, p. 583-589, 2009.

SARAFIDOU, T.; STAMATIS, C.; KALOZOUMI, G.; SPYROU, V.; FTHENAKIS, G.C.; BILLINIS, C.; MAMURIS, Z. Toll Like Receptor 9 (TLR9) polymorphism G520R in sheep is associated with seropositivity for small ruminant lentivirus. **PLoS ONE**, v. 8, p. e63901, 2013.

HERRMANN-HOESING, L.; WHITE, S.N.; MOUSEL, M.R.; LEWIS, G.S.; KNOWLES, D.P. Ovine progressive pneumonia provirus levels associate with breed and Ovar-DRB1. **Immunogenetics**, v. 60, p. 749-758, 2008.

LARRUSKAIN, A.; MINGUIJÓN, E.; GARCÍA-ETXEARRIA, K.; MORENO, B.; AROSTEGUI, I.; JUSTE, R.A.; JUGO, B.M. MHC class II DRB1 gene polymorphism in the pathogenesis of Maedi-Visna and pulmonary adenocarcinoma viral diseases in sheep. **Immunogenetics**, v. 62, n. 2, p. 75-83, 2010.

- WHITE, S.N. et al. Genome-Wide Association Identifies Multiple Genomic Regions Associated with Susceptibility to and Control of Ovine Lentivirus. **PLoS ONE**, v. 7, p. e47829, 2012.
- CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D. Eradication of ovine progressive pneumonia from sheep flocks. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 188, p. 1026-1027, 1986.
- HEATON, Michael P. et al. Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 1, p. e1002467, 2012.
- HEATON, M. P. et al. Genetic testing for TMEM154 mutations associated with lentivirus susceptibility in sheep. **PLoS ONE**, v. 8, p. 55490, 2013.
- MOLAEI, Vahid; ELTANANY, Marwa; LUHKEN, Gesine. First survey on association of TMEM154 and CCR5 variants with serological maedi-visna status of sheep in German flocks. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 36, 2018.
- MOLAEI, Vahid; OTAROD, Vahid; ABDOLLAHI, Davood; LUHKEN, Gesine. Lentivirus susceptibility in Iranian and German sheep assessed by determination of TMEM154 E35K. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 685, 2019.
- RAMÍREZ, H. et al. Accurate Diagnosis of Small Ruminant Lentivirus Infection Is Needed for Selection of Resistant Sheep through TMEM154 E35K Genotyping. **Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 83, 2021.
- PAIVA, S. R.; MCMANUS, C. M.; BLACKBURN, H. Conservation of animal genetic resources—A new tact. **Livest. Sci.**, v. 193, p. 32–38, 2016.
- ZOMERDIJK, F.; HIEMSTRA, S. J.; D'ARBAUMONT, M.; TIXIER-BOICHARD, M.; BOETTCHER, P. Quality management practices of gene banks for livestock: a global review. **Biopreserv. Biobank.**, v. 18, n. 3, p. 244-253, 2020.
- FRIEDMAN, M. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 32, p. 675–701, 1937.
- SNP & Variation Suite™, (Versão 8.x) [Software]; Golden Helix, Inc.: Bozeman, MT, EUA. Disponível online: <http://www.goldenhelix.com> (acessado em 15 de novembro de 2019).
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—An update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537–2539, 2012.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol. Ecol. Resour.** v. 10, p. 564–567, 2010.
- PEARSON, K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. **Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.**, v. 50, p. 157-175, 1900.
- PAIVA, S. R. et al. Variabilidade genética das raças de ovinos deslanados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 887-893, 2005.

- PAIM, T. P. et al. Origin and population structure of Brazilian hair sheep breeds. **Animal Genetics**, v. 52, p. 492-504, 2021.
- MCMANUS, C. et al. Landscape genetics of sheep in Brazil using SNP markers. **Small Rumin. Res.**, v. 192, p. 106239, 2020.
- MCMANUS, C.; PAIVA, S. R.; ARAÚJO, R. O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 236-246, 2010.
- CARNEIRO, H.; LOUVANDINI, H.; PAIVA, S. R.; MACEDO, F.; MERNIES, B.; McMANUS, C. Morphological characterization of sheep breeds in Brazil, Uruguay and Colombia. **Small Rumin. Res.**, v. 94, p. 58-65, 2010.
- MCMANUS, C. et al. Pedigree analysis of Brazilian Morada Nova hair sheep. **Small Rumin. Res.**, v. 170, p. 37-42, 2019.
- MURPHY, T.W. et al. Effect of TMEM154 E35K variant (haplotypes 1 and 3) on the incidence of ovine lentivirus infection and ewe productivity during lifetime exposure. **J. Anim. Sci.**, v. 99, 2021, e skab304.
- PASICK, J. Maedi-Visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 241-244, 1998.
- da CRUZ, J.S.; Singh, D.; Lamara, A.; Chebloune, Y. Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. **Viruses**, [S.l.], v. 5, p. 1867-1884, 2013.
- BRAZ, G. F. et al. Genetic and antigenic characterization of Brazilian SRLV strains: Natural small ruminant interspecies transmission from mixed herds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 103, p. 105322, 2022.
- YAMAN, Y.; BAY, V.; AYMAZ, R. A novel 2 bp deletion variant in Ovine-DRB1 gene is associated with increased Visna/maedi susceptibility in Turkish sheep. **Sci. Rep.**, v. 11, p. 14435, 2021.
- LAITY, J.H.; Lee, B.M.; Wright, P.E. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. **Curr. Opin. Struct. Biol.** [online], v. 11, p. 39-46, 2001.
- JÁUREGUI, P.; CRESPO, H.; GLARIA, I.; LUJÁN, L.; CONTRERAS, A.; DE ANDRÉS ROSATI, S. D.; AMORENA, B.; TOWERS, G. J.; REINA, R. Ovine TRIM5 α can restrict visna/maedi virus. **J. Virol.**, v. 86, p. 9504-9509, 2012.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1: ASP, LSP and STA sequences of the SNPs related to Ovine Progressive Pneumonia (OPP).

SNP	ASP1	ASP2	LSP	STA
OAR17_53	AACGGTACGTGGTG	ACGGTACGTGGTG	GCCTCCTCTTACCAGAGCA	GTGGATGAACAG
88531	TGGAATAT	TGGAATAC	CA	CATGAATCGAA
TMEM154				TCAGCGGGACTG
_A13V-FI2	GCTCCGCGCGCCGC	GCTCCGCGCGCCGT	GGACCGCGGCGAGGAA	ACACC
TMEM154	GGCACGTCTCCTGA	GGCACGTCTCCTGA	TCCCACAGGAGAGGAGGA	GCCTCTGACTCTT
_D33N	CAGTTT	CAGTTC	CA	CATCCAGG
TMEM154	AATTTTGTATGTGTT	CAATTTTGTATGTG		TTCGTCTCCATGA
_E31Q_v2	CCCACAGGAC	TCCCACAGGAG	GGGCACGTCTCCTGACAGT	CAAGTCTCA
TMEM154	GGCACGTCTCCTGA	GGCACGTCTCCTGA	CTCCATGACAAGTCTCAATT	ACTCTTCATCCAG
_E35K	CAGTTC	CAGTTT	TTGTATGTGTT	GCCTTCC
TMEM154	TTGACGAAGACACA	TTATTGACGAAGAC	AGAGTAAAATCACTGGGAT	CACAGAACCTTA
_E84Y	GACCAGTTAG	ACAGACCAGTTAT	CAACACCA	CATCACCAGTAT
TMEM154	CTCTCCTGCTTCTAT	CTCTCCTGCTTCTAT	CCTTGTTTATTCCTTTTTCTT	GTGTTGATCCCA
_I102T	CAGCGAT	CAGCGAC	TTATGGTATATTATAAGGA	GTGATTTTACTCT
TMEM154	AACTGGTCTGTGTC	ACTGGTCTGTGTCT	TGACCACAGAACCCTTACAT	AAATCACTGGGA
_I74F	TTCGTCAAT	TCGTCAAA	CACCA	TCAACACCATTAA
TMEM154	ACCGCGGCGAGGA	ACCGCGGCGAGGA		GTGCTTACCCTGC
_L14H	AAT	AAA	CCCCCGAGGCTCCGC	GCC
TMEM154	CCACAGAACCTTAC	CCACAGAACCTTAC	CTCTAACTGGTCTGTGTCTT	AGCACACTTGCTT
_N70I	ATCACCAGTATAAAA	ATCACCAGTATAAT	CGTCA	CAGTGAC
TMEM154	TCGCGTCCCTTCCCA	CTCGCGTCCCTTCC		TTCCTCGCCGCG
_T25I	C	CAT	CCGGGAGTGGAAGCCGA	GTC
TMEM154	TCTTCATCCAGGCCT	CTCTTCATCCAGGC		GTGGTCACTGAA
_T44M	TCCG	CTTCCA	TGTCAGGAGACGTGCCCC	GCAAGTGT
ZNF389_ss	GGACTAGAACTTGA	GACTAGAACTTGAT	ACTTGCAACTGAAAACAAA	AGGTGACTCAGA
748775100	TCTTTGTGGTACTTT	CTTTGTGGTACTTG	CTAACTTACCAA	CTGACAGG

Table S2: Comparison of 14 and 7 common animals genotypes between Fluidigm and Illumina® Ovine SNP50 and Illumina® Ovine 600K, respectively, on locus OAR17_5388531.1

Table S2				
OAR17_5388531.1				
Sample ID	Breed	Illumina Ovine SNP50	Fluidigm	Illumina Ovine 600K
45	Santa Inês	G_G	C_C	x
OBN011	Barriga Negra	A_G	T_C	x
OBN013	Barriga Negra	A_A	T_T	x
OBN015	Barriga Negra	G_G	C_C	x
OBN025	Barriga Negra	A_A	T_T	x
OBN036	Barriga Negra	A_G	T_C	x
OBN040	Barriga Negra	G_G	C_C	x
OBN050	Barriga Negra	G_G	C_C	x
OBN068	Barriga Negra	A_A	T_T	x
OBN070	Barriga Negra	A_G	T_C	x

OMN229	Morada Nova	G_G	C_C	x
OPT028	Pantaneiro	A_G	T_C	x
OPT040	Pantaneiro	G_G	C_C	x
OPT078	Pantaneiro	A_G	T_C	x
OSI1113	Santa Inês	x	C_C	C_C
OSI1114	Santa Inês	x	T_C	T_C
OSI1120	Santa Inês	x	C_C	C_C
OSI1121	Santa Inês	x	T_C	T_C
OSI1123	Santa Inês	x	T_C	T_C
OSI1124	Santa Inês	x	T_C	T_C
OSI1192	Santa Inês	x	C_C	C_C

Table S3: Comparison of 7 and 14 common animals genotypes between KASP and Illumina® Ovine SNP50 and Illumina® Ovine 600K, respectively, on locus OAR17_5388531.1

Table S3				
OAR17_5388531.1				
Samples ID	Breed	Illumina Ovine SNP50	KASP	Illumina Ovine 600K
5	Santa Inês	G_G	C_C	x
7068	Santa Inês	G_G	C_C	x
7156	Santa Inês	G_G	C_C	x
7459	Santa Inês	G_G	C_C	x
7476	Santa Inês	G_G	C_C	x
14	Santa Inês	A_G	C_T	x
42	Santa Inês	A_G	C_T	x
271	Santa Inês	x	C_C	C_C
6350	Santa Inês	x	C_C	C_C
6467	Santa Inês	x	C_C	C_C
6538	Santa Inês	x	C_T	T_C
6539	Santa Inês	x	C_T	T_C
6626	Santa Inês	x	C_C	C_C
6627	Santa Inês	x	C_C	C_C
6919	Santa Inês	x	C_C	C_C
6986	Santa Inês	x	C_C	C_C
7003	Santa Inês	x	C_C	C_C
7040	Santa Inês	x	C_C	C_C
7069	Santa Inês	x	C_C	C_C
7195	Santa Inês	x	C_C	C_C
7305	Santa Inês	x	C_C	C_C

Table S4: Comparison of 10 common animals' genotypes between Fluidigm and Illumina®
Ovine 600K on locus TMEM154_E35K

Table S4			
TMEM154_E35K			
Samples ID	Breed	Fluidigm	Illumina Ovine 600K
OMN6916	Morada Nova	G_G	G_G
OMN8387	Morada Nova	A_A	A_A
OMN8389	Morada Nova	G_G	G_G
SMN_RBM04	Morada Nova	G_G	G_G
SMN_JWR01	Morada Nova	G_G	G_G
SMN_JPFO103	Morada Nova	G_G	G_G
SMN_JLM05	Morada Nova	G_G	G_G
SMN_JLM33	Morada Nova	G_G	G_G
SMN_JDGF_78	Morada Nova	G_G	G_G
SMN_JCG0257	Morada Nova	G_G	G_G

Table S5: Comparison of 27 common animals' genotypes between Fluidigm and KASP on loci TMEM154_E35K, TMEM154_N70I and TMEM154_I102T

Table S5													
Samples ID	Breed	KASP						Fluidigm					
		TMEM154_E35K	TMEM154_N70I	TMEM154_I102T									
2	Santa Inês	G	G	A	A	T	T	G	G	A	A	0	0
8	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
15	Santa Inês	A	G	A	A	T	T	A	G	A	A	T	T
18	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
50	Santa Inês	G	G	T	T	T	T	G	G	T	T	T	T
66	Santa Inês	G	G	A	A	T	T	G	G	A	A	T	T
144	Santa Inês	G	G	A	A	T	T	G	G	A	A	T	T
168	Santa Inês	G	G	A	A	T	T	G	G	A	A	T	T
172	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
174	Santa Inês	0	0	A	A	T	T	G	G	A	A	T	T
177	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
181	Santa Inês	G	G	A	A	T	T	G	G	A	A	T	T
271	Santa Inês	0	0	A	A	T	T	A	G	A	A	T	T
4865	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
5696	Santa Inês	A	G	T	A	T	T	A	G	T	A	T	T
6205	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
6223	Santa Inês	A	G	A	A	T	T	0	0	A	A	0	0
6287	Santa Inês	A	G	A	A	T	T	A	G	A	A	T	T
6300	Santa Inês	G	G	A	A	T	T	G	G	A	A	T	T
6494	Santa Inês	A	G	A	A	T	T	A	G	A	A	T	T
6505	Santa Inês	A	A	0	0	T	T	A	A	T	A	T	T
6533	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
6591	Santa Inês	A	G	T	A	T	T	A	G	T	A	T	T
6632	Santa Inês	A	G	A	A	T	T	A	G	A	A	T	T
7003	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
7040	Santa Inês	G	G	T	A	T	T	G	G	T	A	T	T
7195	Santa Inês	G	G	A	A	T	T	G	G	A	A	T	T

Table S6: Allele frequencies across different populations of the Santa Inês breed.

Table S6								
Allele Frequencies by Populations - Santa Inês								
Locus	Allele	BBGA	CNPC	EBDA-BA	CPAMN	CPATC	GAASA-GO	UnB-DF
TMEM154_A13V-FI2	C	1,000	0,982	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	T	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
TMEM154_E31Q_v2	C	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,000
	G	1,000	1,000	1,000	0,964	1,000	1,000	1,000
TMEM154_D33N	A	0,071	0,331	0,250	0,133	0,186	0,136	0,444
	G	0,929	0,669	0,750	0,867	0,814	0,864	0,556
TMEM154_E35K	A	0,067	0,284	0,250	0,133	0,170	0,136	0,444
	G	0,933	0,716	0,750	0,867	0,830	0,864	0,556
TMEM154_T44M	C	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
TMEM154_N70I	A	0,767	0,671	0,250	0,367	0,607	0,611	0,556
	T	0,233	0,329	0,750	0,633	0,393	0,389	0,444
TMEM154_I74F	A	1,000	0,983	0,500	0,133	0,621	0,438	0,220
	T	0,000	0,017	0,500	0,867	0,379	0,563	0,780
TMEM154_I102T	T	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
OAR17_5388531	C	0,933	0,716	0,750	0,857	0,822	0,864	0,593
	T	0,067	0,284	0,250	0,143	0,178	0,136	0,407
TMEM154_E84Y	A	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Legend:

Breed	Population	Location	N
Santa Inês	Brazilian Animal Germplasm Biobank (BBGA)	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brazil	15
	Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPC)	Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE, Brazil	118
	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA)	Empresa Bahiana de Desenvolvimento Agrícola, Salvador-BA, Brazil	2
	Embrapa Meio-Norte (CPAMN)	Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, Brazil	15
	Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC)	Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, Brazil	59
	Gaasa e Alimentos Ltda (GAASA)	GAASA Alimentos, Inhumas-GO, Brazil	11
	Universidade de Brasília (UnB-DF)	Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil	27

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS ASSOCIADOS À ENFERMIDADES PARA A SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS ASSOCIADOS À ENFERMIDADES PARA A SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL, Camila Souza Rodrigues, Mestranda e Concepta McManus, PhD, Brasília – DF

Um dos maiores desafios da ovinocultura brasileira é otimizar a qualidade da produção, investindo em características importantes para o rebanho, como a resistência a doenças. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um painel reduzido de SNPs associados a enfermidades para a seleção de ovinos de diferentes raças no Brasil. Através da plataforma Fluidigm, foram genotipados SNPs relacionados ao *scrapie*, dermatosparaxia, condrodisplasias, doença de *ricketts* e associação entre presença/ausência de chifres e criptorquidismo nos animais. Foi realizada a extração de DNA de 1040 amostras de sangue de animais de 15 raças de importância para a ovinocultura nacional: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Somalis Brasileira, Bergamácia Brasileira, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel e Barriga Negra. Amostras de sêmen (N = 112) dessas raças mantidas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) também foram incluídas no estudo. Com base nos resultados obtidos pela plataforma, foram estimadas as frequências alélicas e haplotípicas para os marcadores associados as características de interesse. Ainda, foram comparados os resultados obtidos nas diferentes populações da raça Santa Inês, com o objetivo de verificar a existência de fluxo gênico entre elas. No total, dos 32 SNPs relacionados a doenças genotipados no presente estudo, 9 falharam (*call rate* <0,75), restando 23 SNPs bem-sucedidos, ou seja 72% do painel. Além disso, um SNP foi monomórfico, sendo este associado as condrodisplasias. Foram encontrados 23 haplótipos para o *scrapie*, sendo que os haplótipos mais frequentes estão associados ao risco moderado de desenvolver a doença. Nos marcadores relacionados a presença/ausência de chifres e criptorquidismo, foi possível observar que há polimorfismos e

variações nas frequências alélicas entre as raças. A genotipagem de reprodutores para essa região no cromossomo 10 pode ser utilizada como ferramenta de seleção de ovinos da raça Morada Nova, bem como possivelmente de outras raças importantes para a ovinocultura brasileira. Com apenas uma falha dos 11 SNPs analisados, a ferramenta Fluidigm se mostrou adequada para esse desafio. Os SNPs associados as condrodisplasias não demonstraram polimorfismos nas raças utilizadas no presente estudo. Não foi possível estimar as frequências alélicas de outros SNPs associados a dermatosparaxia e doença de *ricketts*, pois estes foram eliminados por baixo *call rate* ($<0,75$). Foi observado ainda a existência de fluxo gênico entre diferentes populações da raça Santa Inês. Por fim, foi possível concluir que a tecnologia Fluidigm é confiável, sendo uma ferramenta útil e financeiramente viável em estudos de melhoramento genético com ovinos no Brasil.

Palavras-chave: SNPs, *Ovis aries*, genotipagem, *scrapie*, doenças ovinas.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A DISEASE-ASSOCIATED SNPS PANEL FOR THE SELECTION OF DIFFERENT SHEEP BREEDS IN BRAZIL, Camila Souza Rodrigues, Master's student e Concepta McManus, PhD, Brasília – DF

One of the biggest challenges for Brazilian sheep farming is optimizing production quality, investing in important economic traits, such as disease resistance. The objective of this work was to develop and validate a reduced panel of disease-associated SNPs for the selection of sheep from different breeds in Brazil. Through the Fluidigm platform, SNPs related to *scrapie*, dermatosparaxis, chondrodysplasia, rickets disease and association between presence/absence of horns and cryptorchidism in animals were genotyped. DNA was extracted from 1040 blood samples from animals of 15 important breeds for the national sheep industry, namely: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Brazilian Somali, Brazilian Bergamasca, Corriedale, Ile de France, Pantaneiro, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel and Black Belly. Semen samples (N = 112) of these breeds maintained at the Brazilian Animal Germplasm Biobank (BBGA) were also included in the study. Based on the results obtained by the platform, the allele and haplotype frequencies were estimated for the markers associated with characteristics of interest. Still, the results obtained in the different populations of the Santa Inês breed were compared, with the objective of verifying the existence of gene flow between them. In total, of the 32 disease-related SNPs genotyped in the present study, 9 failed (call rate <0.75), leaving 23 successful SNPs, or 72% of the panel. Furthermore, one SNP was monomorphic, which is associated with chondrodysplasias. 23 haplotypes were found for scrapie, with the most frequent haplotypes being associated with resistance to the disease. In the markers related to the presence/absence of horns and cryptorchidism, it was possible to observe that there are polymorphisms and variations in allele frequencies between races. The SNPs associated with

chondrodysplasias did not produce polymorphisms in the breeds used in the present study. It was not possible to estimate the allele frequencies of other SNPs associated with dermatosparaxis and rickets disease, as these were removed by low call rate (<0.75). Finally, it was possible to conclude that Fluidigm technology is reliable, being a useful and financially viable tool in genetic improvement studies with sheep in Brazil.

Keywords: SNPs, *Ovis aries*, genotyping, scrapie, sheep diseases.

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil tem crescido de forma gradativa e pontual nos últimos anos. Atualmente, o país conta com um rebanho de aproximadamente 20,6 milhões de cabeças, que se concentram principalmente na região Nordeste do país (IBGE, 2021). No Brasil, especificamente na região Nordeste do país, a criação de ovinos é voltada principalmente para a produção de carne, leite e couro, com ênfase em raças deslanadas, que possuem alta rusticidade e adaptação ao clima do país (Codevasf, 2011).

As raças brasileiras naturalizadas ou localmente adaptadas são separadas em duas categorias: deslanadas (Santa Inês, Morada Nova, Somalis Brasileira, Barriga Negra e Rabo Largo) e lanadas (Crioula Lanada, Bergamácia Brasileira e Pantaneira). Há ainda raças comerciais internacionais de grande importância no país, tais como: Suffolk, Hampshire, Texel, Dorper, Dâmara, Corriedale e Ile de France (McManus et al., 2013; Hermuche et al., 2013). Os bancos genéticos são ferramentas cruciais para garantir a variabilidade genética e a conservação *ex situ* das raças (Paiva et al., 2019; Zomerdijk et al., 2020). No Brasil, o principal banco genético que mantém preservadas amostras de sêmen, germoplasma e DNA ovino é o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) (Paiva et al., 2019).

Além da conservação genética das raças localmente adaptadas, um dos desafios atuais da ovinocultura brasileira é otimizar a qualidade da produção, focando no bem-estar animal e na resistência a doenças. O *scrapie*, ou paraplexia enzoótica dos ovinos, é uma doença priônica pertencente ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs) e afeta rebanhos ovinos mundialmente, devendo ser observada, uma vez que pode vir a ser prejudicial no Brasil. A enfermidade é caracterizada por sintomas neurológicos e afeta ovinos globalmente (Prusiner, 1998). Polimorfismos nos códons 136 A (Alanina)/V (Valina), 154 R (Argenina)/ H (Histidina) e 171 Q (Glutamina)/R/H no gene *Prion Protein* (PRNP) foram associados a resistência/susceptibilidade a doença (Hunter et al., 1996; Belt et al., 1995; Clouscard et al., 1995; Bossers et al., 1997). Dawson et al. (1998) indicam o risco de

desenvolver a doença baseado em grupos de genótipos, que podem ser observados na tabela 1. Outros polimorfismos associados ao *scrapie* incluem as variantes *M112T*, *M137T*, *N176K* (Laegreid et al., 2008; Vaccari et al., 2009), *L237P*, *P168L* e *A136V*, além de variações no códon 141 (Heaton et al., 2010; Goldmann et al., 2006; Mazza et al., 2010).

Tabela 1. Resistência/susceptibilidade ao *scrapie* em ovinos de acordo com o genótipo. Adaptado de Dawson et al. 2008.

Grupo	Genótipo	Resistência/Susceptibilidade
1	ARR/ARR	Maior Resistência indivíduo e progênie
2	ARR/AHQ	Resistência indivíduo e progênie
	ARR/ARH	
	ARR/ARQ	
3	AHQ/AHQ	Risco moderado / especialmente no ARQ/ARQ risco aumentado para a progênie
	AHQ/ARH	
	AHQ/ARQ	
	ARH/ARH	
	ARH/ARQ	
4	ARQ/ARQ	Ovinos geneticamente susceptíveis ao <i>scrapie</i>
	ARR/VRQ	
5	AHQ/VRQ	Ovinos altamente susceptíveis ao <i>scrapie</i>
	ARH/VRQ	
	ARQ/VRQ	
	VRQ/VRQ	

Além disso, outras enfermidades importantes que afetam ovinos incluem a dermatosparaxia, as condrodisplasias e a doença de *ricketts* (Scott, 2007; Thompson, 2007; Dittmer et al., 2009). A dermatosparaxia é uma enfermidade autossômica recessiva que afeta o tecido conjuntivo dos animais, incluindo ovinos, causando fragilidade e heperextensibilidade da pele (Scott, 2007). A doença é causada pelo polimorfismo c.421G>T no gene *metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 2* (ADAMTS2), e no Brasil já foi identificada em animais da raça White Dorper (Zhou et al., 2012; Andrade et al, 2014).

As condrodisplasias afetam o esqueleto dos animais, causando nanismo e encurtamento da cabeça (Thompson, 2007). Em ovinos, a condição é hereditária recessiva, e, a transversoão T>A em um domínio altamente conservado do gene *Fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3) pode ser a responsável pela doença. Uma deleção no exon 3 de 1 pb na posição 107pb do gene *sodium/sulfate symporters, member 1* (SLC13A1) foi identificada como a possível causa da condição em ovinos Texel (Thompson et al., 2005).

A doença de *ricketts* ou raquitismo, é uma condição autossomal recessiva que

afeta o esqueleto dos animais, resultando em baixos níveis de cálcio e fósforo, além de problemas na absorção e metabolismo da vitamina D em ovinos (Dittmer et al., 2009). Uma mutação no exon 6 (C>T) do gene *dentin matrix protein 1* (DMP1), que resulta em uma proteína não funcional, pode estar relacionada a doença (Zhao et al., 2011).

Estudando as características chifres e criptorquidismo em ovinos, através de um estudo de GWAS (dados ainda não publicados), com animais da raça Morada Nova, identificou uma região no cromossomo 10 que pode estar associada à presença/ausência de chifres, bem como a presença/ausência de criptorquidismo do animal. Nessa região, 11 marcadores SNP apresentaram correlação significativa. Em um trabalho diferente desenvolvido por outro grupo, um SNP também identificado por GWAS se mostrou altamente associado ao fenótipo da presença de chifres no cromossomo 2 abaixo do gene *Metaxin 2* (MTX2) - SNP *OAR:g.132619300G>A*, assim como o SNP *rs405733249* (He et al., 2016).

Painéis de SNPs de baixa densidade podem ser ferramentas eficazes, rápidas e custo-efetivas, sendo ideais em estudos de predição e seleção genética, incluindo para características de resistência/susceptibilidade a doenças em ovinos (Habier et al., 2009; Bolormaa et al., 2015; Faria et al., 2018; Bchara et al., 2018). Com isso, o objetivo desse estudo é validar um painel reduzido de SNPs que contém marcadores associados a doenças que impactam ou podem impactar diretamente a ovinocultura brasileira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem Animal

O presente estudo utilizou 1.040 amostras de sangue de ovinos de 15 raças, mantidos em centros de conservação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) distribuídos pelo país. As raças utilizadas no estudo foram: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Somalis Brasileira, Bergamácia Brasileira, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel e Barriga Negra. Amostras de sêmen (N = 112) de algumas dessas raças mantidas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) também foram incluídas no estudo.

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de purificação Puregene (Kit Gentra Puregene®) para as amostras de sangue e sêmen. A verificação da qualidade do DNA das amostras foi realizada de duas maneiras. Inicialmente, foi utilizado gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando padrões lambda de 200 ng/μg, 100 ng/μg e 50 ng/μg para comparação. Além disso, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro NanoDrop Thermo Scientific (NanoDrop™ 8000, Thermo Fisher Scientific, 2010 <https://www.thermofisher.com/>) para determinação de contaminantes (proteínas e reagentes químicos).

2.2 Genotipagem das Amostras

No presente estudo, a metodologia de genotipagem utilizada foi a Fluidigm EP1™ (Fluidigm, San Francisco, CA, EUA). Resumidamente, os ensaios Fluidigm® SNP Type™ foram projetados para 96 SNPs selecionados previamente com a ferramenta Fluidigm D3™, de acordo com as instruções e regras do fabricante descritas em:

(<https://d3.fluidigm.com/>). Após verificação de qualidade, 90 ng de DNA de cada amostra foram utilizados para genotipagem. Os dados de genotipagem foram gerados de acordo com os protocolos padrão fornecidos pela Fluidigm para uso com a plataforma EP1. Cada amostra foi submetida a pré-amplificação com um conjunto de oligonucleotídeos *primer* locus-específico (*Loco-Specific Primer - LSP*) e *primer* de amplificação alvo-específico (*Specific Target Amplification - STA*) para os SNPs testados. O produto amplificado diluído foi carregado em 12 placas IFCs 96.96 Dynamic Array™ (Fluidigm, San Francisco, CA, EUA), com corante de referência ROX e ensaios contendo *primers* alelo-específicos (*Allele-Specific Primers – ASP*) e oligonucleotídeos LSP para cada SNP, de acordo com as instruções do fabricante. As sequências ASP, LSP e STA estão disponíveis na tabela anexa A. Os ensaios foram conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). Os dados de imagem de fluorescência de endpoint foram adquiridos no EP1 Fluidigm imager, e as chamadas de genótipo foram obtidas pelo Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software. Os marcadores utilizados no estudo e suas referências podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Marcadores associados a doenças que afetam rebanhos ovinos.

Gene/Região	Marcador	Posição	SNP	Referência
PRNP	<i>OAR_PRNP_A136T</i>	exon 3	A/G	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_A136V</i>	exon 3	C/T	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_L141F</i>	exon 3	C/T	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_L237P</i>	exon 3	C/T	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_M112I</i>	exon 3	C/G	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_M112T</i>	exon 3	C/T	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_M137T</i>	exon 3	C/T	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_N176K</i>	exon 3	A/C	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_P168L</i>	exon 3	C/T	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_Q171H</i>	exon 3	G/T	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_Q171K</i>	exon 3	A/C	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_Q171R</i>	exon 3	A/G	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>OAR_PRNP_R154H</i>	exon 3	A/G	Heaton <i>et al.</i> (2010)
	<i>PRNP_rs160575100</i>	exon 3	A/G	Illumina Ovine HD (ISGC)
<i>PRNP_rs412116682</i>	exon 3	A/T	Illumina Ovine HD (ISGC)	
Cromossomo 10	<i>OAR10_29469450</i>	Cromossomo 10	A/G	GWAS – np.
	<i>OAR10_29546872</i>	Cromossomo 10	A/T	GWAS – np.
	<i>OAR10_29907137</i>	Cromossomo 10	A/G	GWAS – np.
	<i>OAR10_29978908</i>	Cromossomo 10	A/C	GWAS – np.
	<i>OAR10_30241199</i>	Cromossomo 10	T/C	GWAS – np.
	<i>OAR10_29065568</i>	Cromossomo 10	T/C	GWAS – np.
	<i>s73573</i>	Cromossomo 10	A/G	GWAS – np.
	<i>s45016</i>	Cromossomo 10	T/C	GWAS – np.
	<i>s26428</i>	Cromossomo 10	T/C	GWAS – np.
	<i>s57500</i>	Cromossomo 10	T/C	GWAS – np.
<i>s68983</i>	Cromossomo 10	A/G	GWAS – np.	
ADAMTS2	<i>ADAMTS2_421GT</i>	exon 2	G/T	Zhou <i>et al.</i> (2012)
FGFR3	<i>FGFR3 -T1719A</i>	exon 11	T/A	Beever <i>et al.</i> (2006)
SLC13A1	<i>SLC13A1_rs401441132</i>	exon 3	A/-	Zhao <i>et al.</i> (2012)
DMP1	<i>DMP1_R145X</i>	exon 6	C/T	Zhao <i>et al.</i> (2011)
MTX2	<i>MTX2_rs423802184</i>	Região intergênica	A/G	He <i>et al.</i> (2016)
MTX2	<i>rs405733249</i>	Região intergênica	G/A	Illumina Ovine HD (ISGC)
np	-	-	não	publicado.

2.3 Análise de dados

Foram conduzidas análises de clusters para definir as classes de genótipos para cada SNP, e o *confidence threshold* aplicado para cada genótipo foi $>0,90$. A decisão de utilizar esse valor, acima do recomendado pelo fabricante Fluidigm ($>0,75$), levou em conta a existência de inconsistência de genótipos entre amostras referências genotipadas com os BeadChips da Illumina, quando em *confidence threshold* mais baixos. Amostras e marcadores, em lotes de 96, passaram por controle de qualidade utilizando o software SNP & Variation Suite v8.9.1 – SVS (Golden Helix, Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Foram eliminadas amostras com *call rate* $< 0,80$ e marcadores com *call rate* $< 0,75$. As frequências alélicas e haplotípicas foram estimadas pelos softwares GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) e Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), respectivamente. Marcadores monomórficos foram excluídos da análise de frequências de haplótipos. Foram analisadas separadamente todas as populações da raça Santa Inês (Tabela 3), e foi realizado o teste de qui-quadrado ($p < 0,05$) para determinar se houve significância estatística nas diferenças de frequências alélicas entre as populações. Os testes estatísticos foram realizados no software SAS (Statistical Analysis Software Institute, Cary, North Carolina).

Tabela 3. Localização do rebanho e número amostral de diferentes populações de ovinos da raça Santa Inês.

População de Ovinos Santa Inês	Localização	N
Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA)	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil	15
Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPQ)	Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE, Brasil	118
Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA)	Empresa Bahiana de Desenvolvimento Agrícola, Salvador-BA, Brasil	2
Embrapa Meio-Norte (CPAMN)	Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, Brasil	15
Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC)	Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, Brasil	59
Gaasa e Alimentos Ltda (GAASA)	GAASA Alimentos, Inhumas-GO, Brasil	11
Universidade de Brasília (UnB-DF)	Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil	27

3. RESULTADOS

3.1 Controle de Qualidade

Nas análises referentes ao *scrapie*, no gene PRNP, 4 SNPs foram eliminados das análises por *call rate* <0,75, sendo eles *OAR_PRNP_A136T*, *OAR_PRNP_L141F*, *OAR_PRNP_L237P* e *PRNP_rs412116682*. Com isso, foram analisados 11 SNPs, sendo eles: *OAR_PRNP_M112T*, *OAR_PRNP_M112I*, *OAR_PRNP_R154H*, *OAR_PRNP_A136V*, *OAR_PRNP_M137T*, *OAR_PRNP_P168L*, *OAR_PRNP_Q171R*, *OAR_PRNP_Q171H*, *OAR_PRNP_Q171K*, *OAR_PRNP_N176K* e *PRNP_rs160575100*. Ainda para o *scrapie*, nenhum SNP foi monomórfico, portanto, todos os SNPs que passaram no controle de qualidade foram utilizados nas análises de frequências alélicas e frequências haplotípicas.

Os SNPs *s73573* (chifres e criptorquidismo), *ADAMTS2_421GT* (dermatosparaxia), *MTX2_rs423802184*, *rs405733249* (presença/ausência de chifres) e *DMP1_R145X* (doença de *ricketts*), com *call rate* <0,75 foram excluídos das análises. Os SNPs *SLC13A1_rs401441132* e *FGFR3-T1719A*, associados a condrodisplasias, passaram no controle de qualidade e, portanto, tiveram as frequências alélicas analisadas, porém, o SNP *SLC13A1_rs401441132* foi monomórfico para o alelo A em todas as populações. Após a aplicação dos filtros de controle de qualidade, das 1152 amostras genotipadas, restaram 845 com *call rate* >0,80 (Tabela 4). No total, dos 32 SNPs relacionados a doenças genotipados no presente estudo, 9 falharam (*call rate* <0,75), restando 23 SNPs bem-sucedidos, ou seja 72% do painel. Além disso, como mencionado anteriormente, é importante ressaltar que um SNP foi monomórfico, sendo este associado as condrodisplasias.

Tabela 4. Número amostral por raça ovina após controle de qualidade (*call rate* < 0,80).

RAÇA/POPULAÇÃO	SIGLA	N
Banco Brasileiro de Germoplasma Animal	BBGA	88
Barriga Negra	OBN	43
Bergamácia Brasileira	OB	39
Corriedale	OC	29
Crioula Lanada	OCL	44
Dâmara	ODA	10
Dorper	ODO	18
Hampshire	OH	14
Ile de France	OIF	39
Morada Nova	OMN	129
Pantaneira	OPT	46
Rabo Largo	ORL	34
Santa Inês	OSI	233
Somalis Brasileira	OS	37
Suffolk	OSUF	28
Texel	OT	14

3.2 Frequências alélicas e haplotípicas dos SNPs relacionados ao *scrapie* em ovinos do Brasil

As frequências alélicas, no loco *OAR_PRNP_Q171K*, apresentadas pelas raças Corriedale, Dâmara, Hampshire, Rabo Largo, Suffolk e Texel foram de 0,500 para o alelo A e 0,500 para o alelo C. Nas demais raças o alelo A foi encontrado como mais frequente. No loco *OAR_PRNP_R154H*, o alelo A também foi o mais frequente. No loco *PRNP_rs160575100*, o alelo G foi o mais frequente na maioria das raças, exceto no BBGA, Hampshire, Morada Nova e Pantaneira, nessas o alelo alternativo A foi o mais frequente. Nos demais loci não foi observado grande variação entre as raças (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências alélicas de 11 SNPs do gene PRNP (*Prion Protein*), relacionado ao *scrapie* em ovinos.

Loco	Alelo	AA	Código do AA	População/Raças ¹															
				BBGA	OBN	OB	OC	OCL	ODA	ODO	OH	OIF	OMN	OPT	ORL	OSI	OS	OSUF	OT
OAR_PRNP_M112T	C	T	Treonina	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000	0,022	0,019	0,002	0,000	0,089	0,000
	T	M	Metionina	1,000	1,000	1,000	0,960	1,000	1,000	1,000	0,929	1,000	1,000	0,978	0,981	0,998	1,000	0,911	1,000
OAR_PRNP_M112I	C	M	Metionina	0,013	0,014	0,240	0,269	0,146	0,200	0,286	0,000	0,318	0,000	0,036	0,240	0,098	0,300	0,450	0,071
	G	I	Isoleucina	0,987	0,986	0,760	0,731	0,854	0,800	0,714	1,000	0,682	1,000	0,964	0,760	0,902	0,700	0,550	0,929
OAR_PRNP_A136V	C	A	Alanina	0,916	1,000	1,000	0,759	0,975	1,000	0,722	1,000	0,730	1,000	0,978	1,000	0,937	1,000	0,929	0,923
	T	V	Valina	0,084	0,000	0,000	0,241	0,025	0,000	0,278	0,000	0,270	0,000	0,022	0,000	0,063	0,000	0,071	0,077
OAR_PRNP_M137T	C	M	Metionina	0,000	0,000	0,054	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,037	0,028	0,067	0,000	0,000
	T	T	Treonina	1,000	1,000	0,946	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	0,967	1,000	1,000	0,963	0,973	0,933	1,000	1,000
PRNP_rs160575100	A	A	Alanina	0,594	0,394	0,362	0,060	0,439	0,286	0,000	0,750	0,411	0,563	0,771	0,339	0,465	0,194	0,019	0,333
	G	S	Serina	0,406	0,606	0,638	0,940	0,561	0,714	1,000	0,250	0,589	0,438	0,229	0,661	0,535	0,806	0,981	0,667
OAR_PRNP_R154H	A	R	Arginina	1,000	0,894	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,814	1,000	1,000	0,952	1,000	1,000	1,000
	G	H	Histidina	0,000	0,106	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,186	0,000	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000
OAR_PRNP_P168L	C	P	Prolina	0,967	0,957	0,667	0,842	0,857	0,900	0,438	0,722	0,575	1,000	0,935	0,921	0,929	0,824	0,500	0,625
	T	L	Leucina	0,033	0,043	0,333	0,158	0,143	0,100	0,563	0,278	0,425	0,000	0,065	0,079	0,071	0,176	0,500	0,375
OAR_PRNP_Q171H	G	Q	Glutamina	0,982	0,962	1,000	0,963	1,000	0,938	1,000	0,917	1,000	0,995	0,927	0,935	0,890	1,000	1,000	1,000
	T	H	Histidina	0,018	0,038	0,000	0,037	0,000	0,063	0,000	0,083	0,000	0,005	0,073	0,065	0,110	0,000	0,000	0,000
OAR_PRNP_Q171R	A	R	Arginina	0,936	1,000	0,987	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	1,000	1,000	0,980	1,000	1,000	1,000
	G	Q	Glutamina	0,064	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000
OAR_PRNP_Q171K	A	K	Lisina	0,640	0,709	0,615	0,500	1,000	0,500	0,500	0,500	0,987	0,533	0,989	0,500	0,536	0,938	0,500	0,500
	C	Q	Glutamina	0,360	0,291	0,385	0,500	0,000	0,500	0,500	0,500	0,013	0,467	0,011	0,500	0,464	0,063	0,500	0,500
OAR_PRNP_N176K	A	N	Asparagina	0,081	0,000	0,267	0,033	0,100	0,000	0,000	0,300	0,333	0,021	0,103	0,077	0,101	0,357	0,023	0,250
	C	K	Lisina	0,919	1,000	0,733	0,967	0,900	1,000	1,000	0,700	0,667	0,979	0,897	0,923	0,899	0,643	0,977	0,750

¹População/Raças: BBGA - Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL- Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel. AA - Aminoácido.

As frequências haplotípicas foram formadas por 11 SNPs do gene PRNP, que apresentaram *call rate* <0,75 e geraram 23 haplótipos diferentes nas raças de ovinos (Tabela 8). É importante mencionar que essa análise gerou frequências consideravelmente altas de dados faltantes (falhas), sendo possível observá-las na figura 1. Os haplótipos encontrados aqui são exclusivamente dos grupos 3 (risco moderado de desenvolvimento de *scrapie*) e 5 (alta susceptibilidade à doença). O haplótipo mais frequente foi o H1 “MIATARPQRKK”, que é do grupo 3, associado ao risco moderado de desenvolvimento da doença, e está presente em 9 das 16 raças analisadas. Seguido do haplótipo H13 “MIATSRPQRKK”, que também é do grupo 3 e está presente em 7 raças, e dos haplótipos H3 “MIATARPQRQK” e H14 “MIATSRPQRQK” ambos também pertencentes ao grupo 3 e presentes em 6 raças cada. Os haplótipos menos frequentes encontrados foram; o H2 “MIATARPQRQN”, H4 “MIATARPQQK” e H5 “MIATARPHRQK” (grupo 3), o haplótipo H6, também em menor frequência “MIVTARPQRQK” (grupo 5 – associado a alta susceptibilidade ao *scrapie*), foi encontrado apenas no BBGA, seguido do H7 “MIATSRRLQRKN” (grupo 3), presente apenas na raça Bergamácia, H8 “MIVTSRPQRKK” (grupo 5), presente apenas na raça Crioula Lanada, H9 “MMVTSRLQRKK” (grupo 5), presente apenas na raça Suffolk, H10 “MMATSRRLQRKN” (grupo 3), encontrado na raça Somalis Brasileira, e por fim, H11 “MMATSRRLQRKK” (grupo 3), presente apenas na raça Texel (Tabela 8).

Tabela 8. Frequências de haplótipos de 11 SNPs do gene PRNP (*Prion Protein*), relacionado ao *scrapie* em ovinos.

População/Raças ¹	H1 ²	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
BBGA	0,079	0,011	0,115	0,011	0,011	0,017						0,018
OBN	0,090		0,047									
OB	0,013		0,038				0,013					0,013
OC												
OCL	0,136							0,011				
ODA												
ODO												
OH	0,036											
OIF												
OMN	0,093		0,054									
OPT	0,163											
ORL	0,029		0,103									
OSI	0,037		0,060									
OS										0,014		
OSUF									0,018			
OT											0,036	

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL – Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel. ²Haplótipos: H1 – MIATARPQRKK; H2 – MIATARPQRQN; H3 – MIATARPQRQK; H4 – MIATARPQQQK; H5 – MIATARPHRQK; H6 – MIVTARPQRQK; H7 – MIATSRLQRKN; H8 – MIVTSRPQRKK; H9 – MMVTSRLQRKK; H10 – MMATSRLQRKN; H11 – MMATSRLQRKK; H12 – MIATARPQQKK.

Tabela 8 Cont. Frequências de haplótipos de 11 SNPs do gene PRNP (*Prion Protein*), relacionado ao *scrapie* em ovinos.

População/Raças ¹	H13 ²	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	Dados faltantes
BBGA	0,097	0,017	0,011									0,614
OBN	0,119			0,026	0,020							0,698
OB												0,923
OC		0,017										0,983
OCL	0,057		0,011			0,011						0,773
ODA		0,050					0,050					0,900
ODO								0,028	0,028			0,944
OH		0,036										0,928
OIF						0,013			0,013			0,974
OMN	0,058	0,024		0,024	0,026							0,721
OPT						0,011				0,022		0,804
ORL	0,044							0,015		0,015	0,029	0,765
OSI	0,028	0,041								0,010		0,824
OS	0,041						0,027				0,027	0,892
OSUF								0,018	0,018			0,946
OT												0,964

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL – Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel. ²Haplótipos: H13 – MIATSRPQRKK; H14 – MIATSRPQRQK; H15 – MIVTARPQRKK; H16 – MIATAHPQRQK; H17 – MIATSHPQRQK; H18 – MIATARPQRKN; H19 – MMATSRPQRKK; H20 – MMATSRPQRQK; H21 – MIATSRPQRQK; H22 – MIATSRPQRQK; H23 – MIATSRPQRKN.

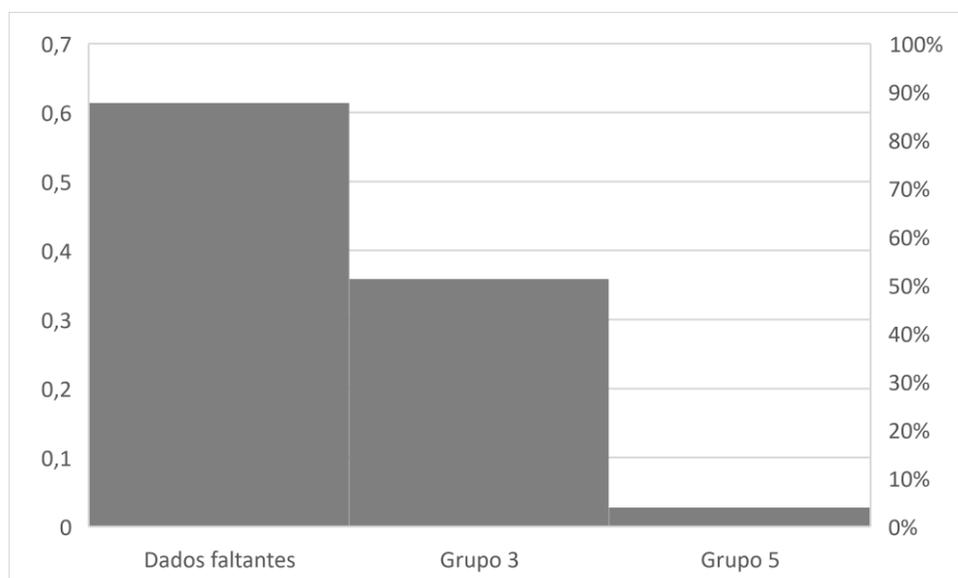


Figura 1. Histograma das frequências haplotípicas de acordo com o grupo de risco de susceptibilidade ao *scrapie* em ovinos brasileiros.

3.4 Frequências alélicas dos SNPs associados aos chifres e criptorquidismo em ovinos

Foram genotipados o SNP denominado *MTX2_rs423802184* também identificado pela literatura como relacionado a presença/ausência de chifres, além de 11 locos na região do Cromossomo 10 ovino, sendo que 10 deles apresentaram *call rate* >0,75 e tiveram as frequências alélicas estimadas. O SNP *s73573* foi excluído das análises, pois apresentou *call rate* <0,75. É possível observar algumas diferenças entre populações. A população BBGA, por exemplo, demonstrou alto polimorfismo em quase todos os locos, exceto nos locos *OAR10_29469450* e *s57500*, onde os alelos T foram mais frequentes com 0,810 e 0,969, respectivamente. Por outro lado, a raça Hampshire apresentou pouco polimorfismo nos locos estudados, com exceção de *OAR10_29907137* e *s45016*. Ainda sobre o loco *OAR10_29469450*, nota-se que o alelo T está quase fixado em todas as populações, exceto nas raças Crioula Lanada e Rabo Largo (Tabela 9).

No loco *OAR10_29065568* foi observado que o alelo T possui maior

frequência na maioria das populações, exceto na raça Hampshire, onde o alelo C é o mais frequente (0,750). De maneira similar, no loco *OAR10_29469450* o alelo G foi o mais frequente na maioria das populações, exceto na raça Dâmara, onde o alelo A foi o mais frequente (0,900). No marcador *s57500*, o alelo T está fixado na maioria das populações, e quase fixado nas restantes, sendo assim um marcador com pouco polimorfismo, inclusive nas raças Santa Inês e Morada Nova, que tiveram baixa frequência para o alelo C deste marcador (Tabela 9).

Tabela 9. Frequências alélicas de 10 SNPs relacionados aos chifres e criptorquidismo em ovinos.

Loco	Alelo	População/Raças ¹															
		BBGA	OBN	OB	OC	OCL	ODA	ODO	OH	OIF	OMN	OPT	ORL	OSI	OS	OSUF	OT
<i>OAR10_29065568</i>	C	0,233	0,274	0,244	0,036	0,227	0,200	0,393	0,750	0,090	0,316	0,283	0,015	0,102	0,054	0,444	0,071
	T	0,767	0,726	0,756	0,964	0,773	0,800	0,607	0,250	0,910	0,684	0,717	0,985	0,898	0,946	0,556	0,929
<i>OAR10_29469450</i>	A	0,190	0,000	0,038	0,052	0,330	0,900	0,000	0,000	0,038	0,134	0,033	0,559	0,002	0,000	0,000	0,000
	G	0,810	1,000	0,962	0,948	0,670	0,100	1,000	1,000	0,962	0,866	0,967	0,441	0,998	1,000	1,000	1,000
<i>OAR10_29546872</i>	A	0,460	0,151	0,423	0,931	0,125	0,000	0,000	0,964	0,910	0,531	0,609	0,059	0,699	0,149	0,875	0,214
	T	0,540	0,849	0,577	0,069	0,875	1,000	1,000	0,036	0,090	0,469	0,391	0,941	0,301	0,851	0,125	0,786
<i>OAR10_29907137</i>	A	0,409	0,198	0,154	0,362	0,511	0,000	0,194	0,571	0,205	0,422	0,359	0,338	0,303	0,122	0,482	0,464
	G	0,591	0,802	0,846	0,638	0,489	1,000	0,806	0,429	0,795	0,578	0,641	0,662	0,697	0,878	0,518	0,536
<i>OAR10_29978908</i>	A	0,517	0,667	0,338	0,379	0,432	0,500	0,750	0,786	0,359	0,516	0,422	0,515	0,498	0,716	0,679	0,821
	C	0,483	0,333	0,662	0,621	0,568	0,500	0,250	0,214	0,641	0,485	0,578	0,485	0,502	0,284	0,321	0,179
<i>OAR10_30241199</i>	C	0,455	0,093	0,308	0,138	0,636	0,600	0,528	0,321	0,231	0,411	0,359	0,544	0,294	0,905	0,536	0,679
	T	0,545	0,907	0,692	0,862	0,364	0,400	0,472	0,679	0,769	0,589	0,641	0,456	0,706	0,095	0,464	0,321
<i>s26428</i>	C	0,756	0,860	1,000	1,000	0,841	1,000	1,000	0,964	1,000	0,645	0,826	0,818	0,840	1,000	0,929	0,923
	T	0,244	0,140	0,000	0,000	0,159	0,000	0,000	0,036	0,000	0,355	0,174	0,182	0,160	0,000	0,071	0,077
<i>s45016</i>	C	0,657	0,709	0,833	0,776	0,557	0,850	0,667	0,500	0,744	0,636	0,762	0,706	0,738	0,716	0,482	0,500
	T	0,343	0,291	0,167	0,224	0,443	0,150	0,333	0,500	0,256	0,364	0,238	0,294	0,262	0,284	0,518	0,500
<i>s57500</i>	C	0,031	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,231	0,148	0,000	0,000	0,023	0,000	0,125	0,000
	T	0,969	0,974	1,000	1,000	1,000	1,000	0,944	1,000	0,769	0,852	1,000	1,000	0,977	1,000	0,875	1,000
<i>s68983</i>	A	0,449	0,791	0,385	0,069	0,466	0,800	0,778	0,000	0,115	0,539	0,348	0,691	0,248	0,797	0,018	0,071
	G	0,551	0,209	0,615	0,931	0,534	0,200	0,222	1,000	0,885	0,461	0,652	0,309	0,752	0,203	0,982	0,929

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL – Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel.

3.5 Frequências alélicas de outros SNPs associados a doenças em ovinos

O SNP *ADAMTS2_421GT* que de acordo com a literatura é associado à dermatosparaxia em ovinos e o SNP *DMP1_R145X* que possui associação positiva com a doença de *ricketts*, foram eliminados por apresentar *call rate* <0,75. O SNP *SLC13A1_rs401441132* associado a condrodisplasias não apresentou polimorfismo em nenhuma das raças aqui analisadas com frequência de 100% para o alelo A.

O loco *FGFR3 -T1719A*, também associado a condrodisplasias apresentou-se em monomorfismo para o alelo T em quase todas as raças analisadas, exceto as raças Hampshire e Santa Inês, que apresentaram baixa frequência para o alelo alternativo A, 0,077 e 0,002 respectivamente, que pode ser considerado um alelo raro nas raças de ovinos brasileiras (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências alélicas do SNP *FGFR3 -T1719A*, relacionado as condroplasias e localizado em uma região de interesse no genoma ovino.

Loco	Alelo	População/Raças ¹															
		BBGA	OBN	OB	OC	OCL	ODA	ODO	OH	OIF	OMN	OPT	ORL	OSI	OS	OSUF	OT
<i>FGFR3 -T1719A</i>	A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,077	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
	T	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,923	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	1,000	1,000	1,000

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL- Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel.

3.6 Fluxo gênico entre diferentes populações da raça Santa Inês

Observando os SNPs relacionados com resistência/susceptibilidade ao *scrapie*, foram identificadas divergências nas frequências alélicas entre os rebanhos de Santa Inês que compõe a amostragem da raça. Observando e testando o loco *OAR_PRNP_M112T*, a maioria das populações foi monomórfica para o alelo T, com exceção da população CPAMN, com baixa frequência para o alelo C (0,038) e alta frequência para o alelo T (0,962) (χ^2 , $p > 0,05$). No loco *PRNP_rs160575100*, a população EBDA-BA foi monomórfica para o alelo A. Em algumas populações observamos maior frequência do alelo A, sendo elas: BBGA (0,682), GAASA-GO (0,750) e UnB-DF (0,568), porém as populações CNPC, CPAMN e CPATC, o alelo G foi encontrado como mais frequência com 0,566, 0,636 e 0,565, respectivamente (χ^2 , $p < 0,05$). No loco *OAR_PRNP_Q171K* a frequência encontrada é dividida entre os alelos A e C 0,500 na maior parte das populações, já as populações CPAMN e CPATC, o alelo A foi o mais frequente, com 0,933 e 0,525, respectivamente, neste loco as diferenças também foram estatisticamente significativas (χ^2 , $p < 0,05$), sendo que na população CPAMN o alelo A está praticamente fixado (Tabela 12).

Tabela 12. Frequências alélicas em diferentes populações da raça Santa Inês para os SNPs relacionados a característica de resistência/susceptibilidade ao *scrapie*.

Loco	Alelo	Populações ¹						
		BBGA	CNPC	EBDA- BA	CPAMN	CPATC	GAASA- GO	UNB- DF
<i>OAR_PRNP_M112T</i>	C	0,000	0,000	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000
	T	1,000	1,000	1,000	0,962	1,000	1,000	1,000
<i>OAR_PRNP_M112I</i>	C	0,000	0,059	0,000	0,250	0,186	0,000	0,158
	G	1,000	0,941	1,000	0,750	0,814	1,000	0,842
<i>OAR_PRNP_A136V</i>	C	0,667	0,982	1,000	1,000	0,788	0,938	1,000
	T	0,333	0,018	0,000	0,000	0,212	0,063	0,000
<i>OAR_PRNP_M137T</i>	C	0,000	0,000	0,250	0,056	0,023	0,000	0,159
	T	1,000	1,000	0,750	0,944	0,977	1,000	0,841
<i>PRNP_rs160575100</i>	A	0,682	0,434	1,000	0,364	0,435	0,750	0,568
	G	0,318	0,566	0,000	0,636	0,565	0,250	0,432
<i>OAR_PRNP_R154H</i>	A	1,000	0,951	1,000	1,000	0,898	1,000	1,000
	G	0,000	0,049	0,000	0,000	0,102	0,000	0,000
<i>OAR_PRNP_P168L</i>	C	1,000	1,000	1,000	0,778	0,792	1,000	0,857
	T	0,000	0,000	0,000	0,222	0,208	0,000	0,143

<i>OAR_PRNP_Q171H</i>	G	0,923	0,837	1,000	1,000	0,885	1,000	0,979
	T	0,077	0,163	0,000	0,000	0,115	0,000	0,021
<i>OAR_PRNP_Q171R</i>	A	0,950	0,996	1,000	1,000	0,991	1,000	0,870
	G	0,050	0,004	0,000	0,000	0,009	0,000	0,130
<i>OAR_PRNP_Q171K</i>	A	0,500	0,500	0,500	0,933	0,525	0,500	0,500
	C	0,500	0,500	0,500	0,067	0,475	0,500	0,500
<i>OAR_PRNP_N176K</i>	A	0,000	0,014	0,250	0,222	0,256	0,357	0,107
	C	1,000	0,986	0,750	0,778	0,744	0,643	0,893

¹Populações: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; CNPC – Embrapa Caprinos e Ovinos; CPATC – Embrapa Tabuleiros Costeiros; CPAMN – Embrapa Meio Norte; EBDA-BA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola; GAASA-GO – Goiás Alimentos; UNB-DF – Universidade de Brasília.

Os SNPs possivelmente relacionados com presença/ausência de chifres e criptorquidismo nos animais, também foram analisados separadamente em cada população de ovinos da raça Santa Inês. No loco *OAR10_29469450* o alelo G está fixado na maioria das populações, com exceção da UNB-DF, que apresentou baixa frequência (0,019) para o alelo A (χ^2 , $p > 0,05$). No loco *OAR10_29546872* o alelo A foi o mais frequente na maioria das populações, com exceção da população EBDA-BA, onde o alelo T foi significativamente mais frequente com 0,750 (χ^2 , $p < 0,05$). No loco *OAR10_29978908* o alelo A foi o mais frequente nas populações BBGA (0,533), CNPC (0,543), CPAMN (0,600) e EBDA-BA (0,750). Alternativamente, o alelo C foi o mais frequente nas populações CPATC (0,535), GAASA-GO (0,773) e UNB-DF (0,615) (χ^2 , $p < 0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Frequências alélicas em diferentes populações da raça Santa Inês para a características de Chifres e Criptorquidismo.

Loco	Alelo	Populações ¹						
		BBGA	CNPC	CPATC	CPAMN	EBDA-BA	GAASA-GO	UNB-DF
<i>OAR10_29065568</i>	C	0,167	0,021	0,207	0,133	0,000	0,227	0,154
	T	0,833	0,979	0,793	0,867	1,000	0,773	0,846
<i>OAR10_29469450</i>	A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019
	G	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,981
<i>OAR10_29546872</i>	A	0,700	0,763	0,703	0,533	0,250	0,545	0,648
	T	0,300	0,237	0,297	0,467	0,750	0,455	0,352
<i>OAR10_29907137</i>	A	0,300	0,263	0,373	0,367	0,250	0,318	0,315
	G	0,700	0,737	0,627	0,633	0,750	0,682	0,685
<i>OAR10_29978908</i>	A	0,533	0,543	0,465	0,600	0,750	0,227	0,385

	C	0,467	0,457	0,535	0,400	0,250	0,773	0,615
<i>OAR10_30241199</i>	C	0,267	0,360	0,093	0,533	0,000	0,273	0,352
	T	0,733	0,640	0,907	0,467	1,000	0,727	0,648
<i>s26428</i>	C	0,833	0,752	0,948	0,964	0,250	0,909	0,942
	T	0,167	0,248	0,052	0,036	0,750	0,091	0,058
<i>s45016</i>	C	0,714	0,695	0,839	0,900	1,000	0,818	0,593
	T	0,286	0,305	0,161	0,100	0,000	0,182	0,407
<i>s57500</i>	C	0,000	0,008	0,000	0,267	0,000	0,000	0,000
	T	1,000	0,992	1,000	0,733	1,000	1,000	1,000
<i>s68983</i>	A	0,267	0,157	0,379	0,333	1,000	0,364	0,222
	G	0,733	0,843	0,621	0,667	0,000	0,636	0,778

¹Populações: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; CNPC – Embrapa Caprinos e Ovinos; CPATC – Embrapa Tabuleiros Costeiros; CPAMN – Embrapa Meio Norte; EBDA-BA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola; GAASA-GO – Goiás Alimentos; UNB-DF – Universidade de Brasília.

A mesma análise foi conduzida para os SNPs associados às condroplasias. O loco *FGFR3 -T1719A*, de maneira geral, apresenta frequência elevada do alelo T, apenas a população de Santa Inês do CPATC apresentou frequência baixíssima (0,009) do alelo A (χ^2 , $p < 0,05$), evidenciando a raridade desse alelo. O loco *SLC13A1_rs401441132* associado a condrodisplasias apresenta-se monomórfico para a raça Santa Inês (alelo A) (Tabela 14).

Tabela 14. Frequências alélicas em diferentes populações da raça Santa Inês para SNPs em outras regiões associados a enfermidades no genoma ovino.

Loco	Alelo	Populações ¹						
		BBGA	CNPC	CPATC	CPAMN	EBDA-BA	GAASA-GO	UNB-DF
<i>FGFR3 -T1719A</i>	A	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
	T	1,000	1,000	0,998	1,000	1,000	1,000	1,000

¹Populações: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; CNPC – Embrapa Caprinos e Ovinos; CPATC – Embrapa Tabuleiros Costeiros; CPAMN – Embrapa Meio Norte; EBDA-BA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola; GAASA-GO – Goiás Alimentos; UNB-DF – Universidade de Brasília.

4. DISCUSSÃO

Após o controle de qualidade, no gene PRNP, relacionado ao *scrapie* em ovinos, 4 SNPs (*OAR_PRNP_A136T*, *OAR_PRNP_L141F*, *OAR_PRNP_L237P* e *PRNP_rs412116682*), foram eliminados por apresentarem *call rate* <0,75. Ou seja, funcionaram em menos que 75% da amostragem total e foram desconsiderados de todas as análises seguintes. O mesmo filtro de qualidade foi aplicado para os SNPs *s73573* (chifres e criptorquidismo), *ADAMTS2_421GT* (dermatosparaxia), *MTX2_rs423802184* e *rs405733249* (presença/ausência de chifres) e *DMP1_R145X* (doença de *ricketts*), com *call rate* <0,75 também foram excluídos das análises. Para a validação do painel, os SNPs projetados passaram por 12 eventos de PCR em placas de 96.96, nas quais cada execução deve ser considerada como um evento separado, o que pode ter sido a causa do baixo rendimento em alguns marcadores.

No total foram genotipados 32 marcadores, sendo que 9 deles falharam, gerando um percentual de 28% de falhas. Com isso, 72% dos marcadores passaram no controle de qualidade, porém um deles foi monomórfico. Isso indica uma oportunidade de melhorar o painel em estudos futuros, eliminando marcadores que não funcionaram ou que não foram polimórficos para as raças de importância na ovinocultura nacional.

O filtro de qualidade para amostras eliminou 307 (35%) das 1152 amostras genotipadas, sendo necessário otimizar o painel para que em novas genotipagens, esse tipo de dados não seja perdido. Isso pode ter ocorrido devido ao alto *confidence threshold* estabelecido para cada genótipo, >0,90, muito acima do recomendado pelo fabricante Fluidigm (>0,75), aumentando assim a precisão dos resultados e evitando genótipos errados. Isso porque ao comparar os genótipos obtidos com a metodologia Fluidigm e os BeadChips Illumina OvineSNP50 e OvineSNP600, quando utilizando o *confidence threshold* do fabricante, as amostras apresentavam divergências entre genótipos. É válido ressaltar que cada

placa genotipada representa uma reação de PCR diferente, e é considerada um evento de genotipagem independente. Essa é a primeira vez que um painel de genotipagem que engloba múltiplas características é feito com ovinos de raças brasileiras. Dessa forma, otimizações e adaptações futuras devem ser feitas para garantir o melhor desempenho do painel.

Em ovinos, o gene da proteína priônica (PRNP) está localizado no cromossomo 13 e consiste em 3 exons, de 52, 98 e 4028 pares de bases (pb) cada, que são separados por 2 íntrons de 2421 e 14031 pb, sendo que a janela aberta de leitura (*Open Reading Frame – ORF*) está localizada no exon 3, e a proteína priônica resultante possui 256 aminoácidos (Goldmann et al., 2005). Estudos anteriores reportaram o gene PRNP como sendo altamente polimórfico, sendo que os códons 136, 154 e 171 estariam diretamente relacionados à resistência/susceptibilidade ao *scrapie* (Goldmann, 2008; Belt et al., 1995, Hunter et al., 1996). Globalmente, os haplótipos mais comuns encontrados em diversas raças ovinas são: ARR, ARQ, AHQ e VRQ (Bossers et al., 1997; Hunter et al., 1996; Laplanche et al., 1993). No presente estudo, todas essas variantes foram reportadas.

Nesta investigação, os quatro haplótipos mais comuns (H1, H13, H3 e H14), encontrados na maioria das raças, estão associados ao grupo 3 (risco moderado de desenvolvimento do *scrapie*). A literatura descreve que o alelo T do SNP *OAR_PRNP_M112T* estaria associado ao aumento da resistência à doença em animais da raça Suffolk com o haplótipo ARQ (Laegreid et al., 2008). No presente estudo, esse alelo foi o menos frequente em todas as raças genotipadas, incluindo na raça Suffolk (0,089). Na variante M112I, relatada previamente por Zhang et al. (2004) no haplótipo ARQ, o alelo I foi o mais frequente na maioria das raças genotipadas aqui, estando fixado nas raças Hampshire e Morada Nova. É importante ressaltar que essa variante ainda não foi avaliada para associação com a doença.

Dentre os haplótipos menos comuns reportados nas raças genotipadas (H2, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 e H11), três deles estão relacionados a alta susceptibilidade ao *scrapie* (H6, H8 e H9), encontrados em baixa frequência apenas no BBGA (0,011), Crioula Lanada (0,011) e Suffolk (0,018), respectivamente. Esse resultado indica que mesmo que ocorram em baixa frequência, haplótipos relacionados a alta susceptibilidade ao *scrapie* estão presentes em rebanhos de ovinos brasileiros, como já reportado por estudos anteriores (Sotomaior et al., 2008; Ianella et al., 2012; Santos et al., 2012; Faria et al., 2018). No presente estudo, na raça Santa Inês não foi observada a ocorrência de nenhum dos haplótipos associados a maior susceptibilidade à doença. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Sotomaior et al. (2008) e Lima et al. (2007), sendo que o haplótipo mais

susceptível (VRQ), mesmo que em baixa frequência, já foi reportado nessa raça por Ianella et al. (2012), Santos et al. (2012) e Faria et al. (2018).

No presente estudo, foram observados, mesmo que em baixa frequência, a ocorrência de haplótipos associados à alta susceptibilidade ao *scrapie* nas raças Crioula Lanada e Suffolk. No Brasil, em ovinos da raça Suffolk, o haplótipo VRQ, altamente susceptível, já foi reportado anteriormente por Ianella et al. (2012), no entanto o número amostral foi considerado pequeno. Outros estudos reportaram a ocorrência de ARQ/VRQ na raça Dorper, o que indica a necessidade de observar os rebanhos, evitando o contato dos animais com o agente infeccioso causador da enfermidade (Andrade et al., 2016).

A presença de haplótipos relacionados a alta susceptibilidade ao *scrapie* no BBGA, mesmo que em baixa frequência, pode ser explicada pela variedade de amostras presentes no banco, incluindo das raças Crioula Lanada e Suffolk, que também foram genotipadas no presente estudo. Nas demais raças, não foram reportados haplótipos associados à alta susceptibilidade a doença. No entanto, é necessário enfatizar que as raças Damara, Dorper, Hampshire e Texel tiveram o número amostral relativamente pequeno ($N < 20$), o que pode ter contribuído para a ausência desses haplótipos. É interessante considerar ainda que as análises de estimativas de haplótipos realizadas aqui para essa característica, demonstraram um alto número de dados faltantes, o que deve ser levado em consideração em estudos futuros.

Na raça Suffolk, além do haplótipo H9, relacionado à alta susceptibilidade ao *scrapie*, foram observados os haplótipos H20 e H21. Dawson et al. (1998) aponta que excepcionalmente na raça Suffolk, a variante “ARQ”, presente em ambos os haplótipos H20 e H21, está associada à susceptibilidade a doença, enquanto o haplótipo “AHQ” é associado à resistência. No presente estudo, nenhum dos haplótipos encontrados possui a variante “AHQ” nessa raça, no entanto, como já foi citado acima, muitas falhas foram observadas, o que pode ser explicado pelo fato de a metodologia utilizada aqui ser inédita. Tal observação se estende às raças Bergamácia, Corriedale, Damara, Dorper, Hampshire, Ile de France e Texel, que tiveram as mais altas porcentagens de dados faltantes nas estimativas de frequências haplotípicas para o *scrapie*.

As variantes M137T e N176K no haplótipo ARQ foram previamente associadas a resistência ao *scrapie* na raça italiana Sarda (Vaccari et al., 2009). Na presente investigação, essa variante foi reportada em 3 dos 4 haplótipos mais comuns (H1, H3 e H14). Mazza et al. (2010) reportou que variações no códon 141 podem estar relacionadas a forma atípica do *scrapie* conhecida como variante Nor98. Esse códon não foi investigado aqui,

porém, é válido ressaltar que não há registros de *scrapie* atípica (Nor98) no Brasil (CFSPH, 2016).

Novas variantes também foram reportadas em investigações interiores, tais como L237P, P168L e A136V (Heaton et al., 2010; Goldmann et al., 2006). Na variante P168L, Goldmann et al. (2006) indica que a substituição de P (Prolina) para L (Leucina) pode ser associada à resistência à inoculação experimental pela doença, sendo que animais heterozigotos sobreviviam mais tempo. No presente estudo quase todas as raças genotipadas foram heterozigotas, com exceção da raça Morada Nova, que foi monomórfica para o alelo C, que codifica prolina. No códon A136V, o alelo C que codifica o aminoácido alanina foi o mais frequente em todas as raças, o que pode indicar uma maior resistência ou resistência intermediária à doença (Baylis et al., 2002; Belt et al., 1995; Hunter et al., 1996). A variante L237P não foi investigada no presente estudo, no entanto, seu significado funcional ainda não é claro (Heaton et al., 2010).

O *scrapie* afeta rebanhos de ovinos de várias partes do mundo, incluindo Reino Unido, Alemanha, França, Canadá e Brasil (Dawson et al.; 2008; Groschup et al., 2007; Harrington et al., 2010; Pohl de Souza et al., 2005). No Brasil, a doença não é frequente, sendo que sua última ocorrência foi reportada em 2017, em ovinos da raça Dorper no município de Pouso Redondo, Santa Catarina (Furlan et al., 2018). Apesar disso, o status de resistência/susceptibilidade ao *scrapie* já foi investigado em várias raças no país, tais como Morada Nova, Hampshire, Suffolk, Dorper, Dâmara, Corriedale, Ile de France, Bergamácia Brasileira, Crioula Lanada, Rabo Largo, Pantaneira, Somalis Brasileira, Santa Inês e Dorset (Passos et al., 2008; Pacheco et al., 2007; Ianella et al., 2012; Sotomaior et al., 2015; Faria et al., 2018; Andrade et al., 2018).

Em ovinos, estudos prévios sobre a evolução molecular do gene PRNP indicam que o alto grau de polimorfismo desse gene pode estar relacionado a seleção de equilíbrio, processo que mantém a diversidade genética em uma população (Slate, 2005). Nesse sentido, Vaccari et al. (2009) levantam a hipótese de que a manutenção da variabilidade genética dentro do gene, com a ocorrência de múltiplos alelos resistentes, pode ter beneficiado populações de ovinos, uma vez que existe uma variedade de cepas de *scrapie* que possuem diferentes alvos dentro do gene. É importante mencionar ainda que estudos experimentais confirmaram uma maior virulência do agente causador de EEB (Encefalopatia Espongiforme Bovina) adaptado a ovinos em comparação ao agente adaptado a bovinos, podendo ser transmitido de forma natural nos rebanhos (Jeffrey et al., 2015).

O marcador *ADAMTS2_421GT*, relacionado a dermatosparaxia em ovinos não

funcionou neste painel, pois apresentou *call rate* <0,75 e foi eliminado. A dermatosparaxia ocorre em vários mamíferos, como humanos (Colige et al., 1999), gatos e cães domésticos (Counts et al., 1980; Panciello et al., 2003) e equinos (Badial et al., 2013). Nos ovinos, a condição já foi reportada em algumas raças, sendo majoritariamente observada na raça White Dorper (Fjølstad & Helle 1974; Ramshaw et al. 1983; van Weeren-Keeverling & Koeman 1986; van Halderen & Green 1988; Aggs 2007; Sucupira et al. 2009, Vaatstra et al. 2011; Grant & Patton 2012). Zhou et al. (2012) relacionou a ocorrência da doença em ovinos da raça White Dorper com a mutação c.421G>T no gene *metallopeptidase com trombospondina tipo 1 motif, 2* (ADAMTS2). Segundo os mesmos autores, quando em homozigose para os alelos mutantes (MM), ocorre a formação de um códon de parada prematuro (TAG), resultando na produção da enzima ADAMTS2 inativa e no processamento inadequado do pró-colágeno em colágeno.

No Brasil, ainda existem poucos estudos relacionados a dermatosparaxia em ovinos. No entanto, a condição já foi investigada e reportada em ovinos White Dorper (Andrade et al., 2014; Andrade et al., 2016; Gouveia et al., 2016; Nogueira et al., 2018) e em animais resultantes do cruzamento entre White Dorper e Santa Inês (Oliveira et al., 2017). No presente estudo, a falha dos marcadores *ADAMTS2_421GT* e *DMP1_R145X* (*call rate* <0,75), indica que a otimização da ferramenta para novas genotipagens ainda é necessária.

Ainda não há muitos estudos sobre a hereditariedade da doença de *ricketts* ou raquitismo em ovinos brasileiros, sendo que internacionalmente, a raça modelo para estudos com esse marcador é a Corriedale (Zhao et al., 2011). Portanto, novos estudos que busquem genotipar animais dos rebanhos nacionais, testando o marcador *DMP1_R145X* para essa característica nas raças brasileiras são necessários.

Sobre as condrodisplasias, Beever et al. (2006) identificaram dois importantes polimorfismos no gene *Fibroblast Growth Factor Receptor 3* (FGFR3): a transversão G-C no exon 11 na posição 955 e a transversão T-A no 9 exon 17 na posição 1719. O presente estudo identificou que no segundo polimorfismo, o *FGFR3 -T1719A*, a maioria das raças apresentou o alelo T como o alelo fixado, com exceção das raças Hampshire e Santa Inês, que tiveram baixa frequência para o alelo A, com 0,077 e 0,002 respectivamente. A mutação pontual T>A ocasiona uma substituição não sinônima de valina-glutamina no domínio tirosina quinase II do FGFR3, levando a perda de função do receptor em animais homozigotos (Drogemuller et al., 2005; Beever et al., 2006). Considerando que o alelo A está associado ao surgimento da condição, a baixa frequência do mesmo em apenas duas raças do estudo pode ser visto como algo positivo. Na deleção *SLC13A1_rs401441132*, todas as raças genotipadas foram

monomórficas para o alelo A. No estudo de Zhao et al. (2012) com ovinos Texel, os animais homozigotos para a deleção do alelo T (g.25513delT) eram os afetados pela condrodisplasias, sendo que os animais do grupo controle, sem condrodisplasias, eram homozigotos TT. No presente estudo, em nenhuma das raças foi observado a deleção do alelo T.

Em ovinos Morada Nova a presença de chifres não está dentro do padrão racial, sendo considerada um fator de desclassificação e descarte dos animais. O criptorquidismo (falha na descida testicular), resulta em machos inférteis ou subférteis, que também são eliminados do rebanho (Pereira et al., 2018). Em um estudo prévio de GWAS (comunicação pessoal), foram identificados 11 marcadores em uma região genômica no cromossomo 10, relacionados com a presença de chifres e ocorrência de criptorquidismo em ovinos Morada Nova. O presente estudo genotipou os animais dessa raça e das demais raças analisadas aqui para essa característica. Embora o SNP *s73573* tenha falhado (*call rate* <0,75) e sido eliminado das análises, as frequências alélicas dos demais SNPs foram estimadas com sucesso para todas as raças.

No estudo GWAS previamente mencionado, foi sugerido que três genes interessantes podem ser candidatos envolvidos na expressão de ambas as características (presença/ausência de chifres e criptorquidismo) sendo eles: *TEX26*, *B3GLCT* e *RXFP2*. Os mesmos autores revelaram que análises de redes do Gene-TF revelaram quatro genes candidatos (*AR*, *NOBOX*, *FOXO3*, *PBX1*) biologicamente ligados ao desenvolvimento de gônadas e apêndices nos animais. Com isso, entende-se que os genes responsáveis pela expressão de ambas as características podem estar muito intimamente ligados, sendo um importante insight sobre a base genética subjacente à ausência de chifres e à incidência de criptorquidismo.

A genotipagem de reprodutores para essa região no cromossomo 10 pode ser utilizada como ferramenta de seleção de ovinos da raça Morada Nova, bem como possivelmente de outras raças importantes para a ovinocultura brasileira. Com apenas uma falha dos 11 SNPs analisados, a ferramenta Fluidigm se mostrou adequada para esse desafio. A diminuição da ocorrência de animais com os fenótipos indesejados pode evitar o descarte de machos de reposição e conseqüentemente, aumentar o número de carneiros que podem ser avaliados. Isso não apenas contribuirá para a otimização dos processos de seleção dos animais, mas também auxiliará na preservação do patrimônio genético das raças, especialmente da raça Morada Nova, que é uma das mais importantes no país.

Conforme os resultados demonstrados por Paiva et al. (2005), McManus et al. (2020) e Paim et al. (2021), espera-se que populações distintas de Santa Inês espalhadas pelo

país apresentem diferenças nas frequências alélicas. Os autores indicam que as distâncias geográficas afetam o fluxo gênico e o nível de miscigenação da raça Santa Inês em determinadas populações. A exemplo disso, ovinos Santa Inês pertencentes ao rebanho da UnB-DF parecem ser miscigenados com a raça Bergamácia Brasileira. McManus et al. (2020) e Paim et al. (2021) propuseram ainda que os animais Santa Inês das regiões Centro-Oeste e Sudoeste são geneticamente mais próximos da raça Bergamácia Brasileira do que em outras regiões do país.

Com relação as diferenças nas frequências alélicas entre diferentes populações da raça Santa Inês, no geral, os SNPs relacionados a doenças demonstraram pouca divergência, revelando que existe um fluxo gênico entre todas as populações de Santa Inês criadas no território nacional. A população que mais divergiu das outras foi a EBDA-BA, mas existe o viés do número amostral reduzido dessa população, com apenas dois indivíduos analisados. As maiores semelhanças entre populações se encontram no BBGA, CNPC, CPAMN e CPATC, o que primeiramente pode ser explicado pela composição do BBGA, que recebe germoplasma dos Núcleos de Conservação da Embrapa. Além disso, outro fator é a troca de germoplasma entre os rebanhos supracitados, especialmente entre o CNPC e CPATC, o fluxo gênico não encontra barreiras geográficas para acontecer visto que as mesmas são suprimidas pelos criadores. As análises de divergência de frequências alélicas não foram aplicadas à raça Morada Nova, uma vez que estes animais se concentram somente na região Nordeste do país, todos próximos aos núcleos de conservação do CNPC que provém germoplasma para os rebanhos (McManus et al., 2019).

Em uma busca de termos relacionados a doenças genéticas ovinas na literatura mundial, foi possível observar que não há forte ligação entre os principais grupos de autores dentro do tema nos últimos anos, como mostra o Anexo B. No Brasil essa interação entre os grupos de autores é ainda menor (Anexo C), sendo necessário considerar a ampliação da colaboração entre os autores para o maior desenvolvimento de pesquisas na área. É importante notar, também, que não há novos grupos se formando na área de pesquisa.

Os resultados obtidos através da validação deste painel são de suma importância para a ovinocultura brasileira. Todas as doenças incluídas nesse painel reduzido foram doenças citadas por produtores de ovinos no Brasil como doenças que já tinham em algum momento acometido seus rebanhos. Por exemplo, a investigação de genótipos e haplótipos favoráveis à resistência genética a doenças que afetam os rebanhos pode auxiliar na seleção de animais com alelos e haplótipos favoráveis. Além disso, o trabalho pode contribuir para auxiliar os bancos genéticos, uma vez que estes devem armazenar todos os

genótipos para facilitar o trabalho futuro sobre susceptibilidade e resistência a doenças, além de garantir a variabilidade genética das raças. Consequentemente, essas metodologias podem ser recursos confiáveis para os criadores, se doenças como o *scrapie* se tornarem uma ameaça, auxiliando assim na conservação da diversidade das raças.

Finalmente, resultados como os aqui encontrados podem auxiliar na conservação a longo prazo da diversidade genética das raças presentes no Brasil, além de funcionar como um recurso importante para os criadores. Além disso, o painel de baixa densidade validado aqui pode contribuir de forma ampla para o melhoramento genético e otimização da produção ovina no Brasil. Isso porque é uma ferramenta financeiramente viável que colabora de forma significativa para estimar as frequências alélicas e haplotípicas presentes nas variadas raças ovinas de importância para a ovinocultura no país.

5. CONCLUSÕES

De modo geral o painel pode ser considerado confiável, sendo necessário otimizar a tecnologia, evitando que haja um alto número de dados faltantes em futuras investigações. A proposta era genotipar 32 marcadores relacionados a doenças, sendo que 23 deles funcionaram, sendo assim o painel teve um rendimento de 72%. No entanto, esse rendimento é de alta confiabilidade, pois houve uma elevação do *confidence threshold* dos alelos.

Haplótipos associados a um risco moderado de desenvolvimento do *scrapie* são frequentes nos rebanhos brasileiros. Isso pode ser visto como uma oportunidade de garantir nos rebanhos nacionais, através de seleção genética, uma maior resistência à doença, ampliando programas de melhoramento nesse sentido. A genotipagem de reprodutores para a região no cromossomo 10, associada à relação chifres e criptorquidismo, pode ser utilizada como ferramenta de seleção de ovinos da raça Morada Nova. Com apenas uma falha dos 11 SNPs analisados, a ferramenta Fluidigm se mostrou adequada para esse desafio. SNPs associados a outras doenças de menor impacto aqui genotipados, não apresentaram frequência significativa dos alelos mutantes causadores das enfermidades em nenhuma das raças estudadas.

Os resultados aqui encontrados mostram a variabilidade genética dentro do BBGA. Algumas raças demonstraram uma menor variabilidade, provavelmente devido ao tamanho amostral reduzido. Foi possível observar ainda a existência fluxo gênico e divergência nas frequências alélicas entre diferentes populações da raça Santa Inês. Os dados obtidos a partir deste painel reduzido de SNPs podem ser usados em estudos de seleção assistida, evitando perdas econômicas e otimizando a condição de bem-estar animal nos rebanhos. Essa é uma alternativa financeiramente eficaz, rápida e eficiente para monitoramento e gerenciamento da resistência/susceptibilidade a enfermidades comuns nos rebanhos de ovinos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGS, R. Screen test for fragile skin. *Agriculture Today*, 2007. Disponível em: <<http://www.dpi.nsw.gov.au/archive/agriculture-today-stories/today-archives/august-2007/fragile-skin>>. Acessado em: 23/01/2023.
- ANDRADE, C. P.; BARBOSA NETO, J. D.; DRIEMEIER, D. Identification of single nucleotide polymorphisms in the prion protein gene in Santa Ines and Dorset sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, 2018.
- ANDRADE, D. G. A. et al. Aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares da dermatosparaxia em ovinos White Dorper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, P. 6, 2014.
- ANDRADE, D. G. A. et al. Prevalence study of SNP c.421G>T in the ADAMTS2 gene responsible for dermatosparaxis in White Dorper sheep in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 4, 2016.
- BADIAL, P.R.; RASHMIR-RAVEN, A.M.; CAGNINI, D.Q. Marjolin's ulcer in two horses with hereditary equine regional dermal asthenia. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 33, p. 515-522, 2013.
- BAYLIS, M.; GOLDMANN, W.; HOUSTON, F.; et al. Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. **Journal General Virology**, v. 83, p. 2907-2914, 2002.
- BCHARA, M. et al. Validação de um painel reduzido de marcadores moleculares associados com susceptibilidade ao vírus da pneumonia ovina. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 5., 2018, Fortaleza.
- BEEVER, J.; SMIT, M.A.; MEYERS, S.; et al. A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. **Animal genetics**, v. 37, p. 66-71, 2006.
- BELT, P. B. G. M.; MUILEMAN, I. H.; SCHREUDER, B. E. C.; et al. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 509–517, 1995.
- BOLORMAA, S.; GORE, K.; VAN DER WERF, J.H.; et al. Design of a low-density SNP chip for the main Australian sheep breeds and its effect on imputation and genomic prediction accuracy. **Anim Genet.**, v. 46, n. 5, p. 544-556, 2015.
- BOSSERS, A.; BELT, P. B. G. M.; REYMOND, G. J.; et al. Scrapie susceptibility-linked

- polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to proteaseresistant forms. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 94, p. 4931–4936, 1997.
- CLOUSCARD, C.; BEAUDRY, P.; ELSEN, J. M.; et al. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 2097–2101, 1995.
- CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. **Manual de criação de caprinos e ovinos**. 2011. Disponível em: <<https://bit.ly/3eDOZ4W>> Acesso em: 23/01/2023.
- COLIGE, A.; SIERON, A.L.; Li, S.W.; et al. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 65, p. 308-317, 1999.
- COUNTS, D.F.; Byers, P.H.; Holbrook, K.A. Dermatosparaxis in a Himalayan cat: I. Biochemical studies of dermal collagen. **J. Invest. Dermatol.**, v. 74, p. 96-99, 1980.
- DAWSON, M.; HOINVILLE, L. J.; HOISE, B. et al. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record*, v. 142, p. 623–625, 1998.
- DAWSON, M.; MOORE, R.C.; BISHOP, S.C. Progress and limits of PrP gene selection policy. **Vet. Res.**, v. 39, n. 4, p. 25-36, 2008.
- DITTMER, K.E.; THOMPSON, K.G.; BLAIR, H.T. Pathology of inherited rickets in Corriedale sheep. **J Comp Pathol.**, v. 141 n. 2, p. 147-55, 2009.
- DRÖGEMÜLLER, C.; WÖHLKE, A.; DISTL, O. Spider Lamb Syndrome (SLS) mutation frequency in German Suffolk sheep. **Animal Genetics**, v. 36, p. 539-540, 2005.
- 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**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FARIA, D. A. et al. Validação de um painel reduzido de marcadores moleculares relacionados à susceptibilidade ao scrapie em ovinos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 5., 2018, Fortaleza.
- FJOLSTAD, M. & Helle O. A hereditary dysplasia of collagen tissues in sheep. **J. Pathol.** V. 112, p. 183-188, 1974.
- FURLAN, L.V. et al. Surto de scrapie em ovinos no estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 15-17, 2018.
- GOLDMANN, W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. **Vet. Res.**, v. 39 n. 4, p. 14, 2008.
- GOLDMANN, W.; BAYLIS, M.; CHIHOTA, C.; et al. Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, p. 1294-1302, 2005.

- GOLDMANN, W; HOUSTON, F; STEWART, P; et al. Ovine prion protein variant A (136) R (154) L (168) Q (171) increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. **J Gen Virol.**, v. 87, n. 12, p. :3741-3745, 2006.
- GOUVEIA, J.J.S. et al. Molecular and genealogical analyses reveal multiple sources of the mutation associated with dermatosparaxis in Brazilian White Dorper sheep. **Small Ruminant Research.**, v. 140, p. 46-49, 2016.
- GRANT, D. & PATTON, W. Dermatosparaxis in White Dorpers, 2012. Disponível em: http://www.dorper.org/PDF_SALE/DERMATOSPARAXIS.pdf Acessado em 23/01/2023.
- GROSCHUP, M. H. et al. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1201-1207, 2007.
- HABIER, D.; FERNANDO, R.L.; DEKKERS, J.C. Genomic selection using low-density marker panels. **Genetics**, v. 182, p. 343–53, 2009.
- HARRINGTON, N. P. et al. Prion genotypes of scrapie-infected Canadian sheep 1998- 2008. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.74, p.228-232, 2010.
- HE, X.; ZHOU, Z.; PU, Y.; et al. Mapping the four-horned locus and testing the polled locus in three Chinese sheep breeds. **Anim Genet.**, v. 47, n. 5, p. 623-7, 2016.
- HEATON, M.P.; LEYMASTER, K.A.; KALBFLEISCH, T.S. et al. Ovine reference materials and assays for prion genetic testing. **BMC Vet Res**, v. 6, n. 23, p.16, 2010.
- HERMUCHE, P. M. et al. Dynamics of Sheep Production in Brazil. **ISPRS International Journal of Geo-Information**, v. 2, n. 3, p. 665-679, 2013.
- HUNTER, N.; FOSTER, J. D.; GOLDMANN, W.; et al. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. **Archives of Virology**, v. 141, p. 809–824, 1996.
- IANELLA, P.; MCMANUS, C.M.; CAETANO, A.R.; PAIVA, S.R. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: Issues for conservation and breeding programs. **Res Vet Sci.**, v. 90, p. 2019-225, 2012.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal (PPM)**. Rio de Janeiro: IBGE. 2021.
- INTERNATIONAL SHEEP GENOME CONSORTIUM (ISGC). Disponível em: < <http://www.sheepmap.org/> > Acesso em: 24/03/2023.
- JEFFREY, M.; et al. Dynamics of the natural transmission of bovine spongiform encephalopathy within an intensively managed sheep flock. **Vet Res.**, v. 46, p. 126, Oct. 2015.
- LAEGREID, W.W.; CLAWSON, M.L.; HEATON, M.P.; et al. Scrapie resistance in ARQ sheep. **J. Virol.**, v. 82, p. 10318-10320, 2008.

- LAPLANCHE, J.L. et al. PrP Polymorphisms Associated with Natural Scrapie Discovered by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Genomics**, v. 15, n. 1, p. 30-37, 1993.
- LIMA, A. C. B.; BOSSERS, C. E.; SOUZA, S. M. P.; et al. PrP genotypes in a pedigree flock of a Santa Inês sheep. **Veterinary Record**, v. 160, p. 336-337, 2007.
- MAZZA, M.; JULINI, B.; VACCARI, G.; et al. Co-existence of classical scrapie and Nor98 in a sheep from an Italian outbreak. **Res. Vet. Sci.**, v. 88, p. 478-485, 2010.
- MCMANUS, C. et al. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 3, 2013.
- MCMANUS, C.; FACÓ, O.; SHIOTSUKI, L.; et al. Pedigree analysis of Brazilian Morada Nova hair sheep. **Small Rumin. Res.**, v. 170, p. 37-42, 2019.
- MCMANUS, C.; PAIVA, S.R.; CAETANO, A.R.; et al. Landscape genetics of sheep in Brazil using SNP markers. **Small Rumin. Res.**, v. 192, n. 4, 106239, 2020.
- NOGUEIRA, J.F. et al. Deepening the knowledge about dermatosparaxis in Brazilian White Dorper population: Basis for the development and implementation of a genetic disease eradication program in sheep. **Livestock Science.**, v. 217, p. 162-166, 2018.
- OLIVEIRA, M. C.; RAIMUNDA, B. P. S.; SILVEIRA, C. R.; et al. Dermatosparaxia em um ovino: achados clínicos, anatomopatológicos e moleculares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 6, 2017.
- PACHECO, A. C. L.; OLIVEIRA, S. M. P.; GOUVEIA, J. J. S.; et al. Analysis of prion protein gene (PRNP) polymorphisms in healthy Morada Nova sheep reveals the presence of genotypes susceptible to scrapie. **Ciência Animal**, v. 17, p. 27-36, 2007.
- PACIELLO, O.; LAMAGNA, F.; LAMAGNA, B. Ehlers-DanlosLike Syndrome in 2 Dogs: Clinical, Histologic, and Ultrastructural Findings. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 32, p. 13-18, 2003.
- PAIM, T.P.; PAIVA, S.R.; DE TOLEDO, N.M.; et al. Origin and population structure of Brazilian hair sheep breeds. **Anim Genet.**, v. 52, p. 492-504, 2021.
- PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; SALOMÃO, A. N.; et al. (Ed.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019, p. 109-129.
- PAIVA, S.R.; SILVÉRIO, V.C.; FARIA, D.A. et al. Origin of the main locally adapted sheep breeds of Brazil: a RFLP-PCR molecular analysis. **Archivos de Zootecnia**, v.54, p.395-399, 2005.
- PASSOS, D.T.; RIBEIRO, L.A.O.; RODRIGUES, N.C.; et al. PrP polymorphisms in **Brazilian sheep**. **Small Rumin. Res.**, v. 74, p. 130-133, 2008.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic

- software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.
- PEREIRA, A.H.R.; et al. Influência da falha na descida testicular e ausência de chifres sobre os pesos ao nascer e ao desmame e sobre o ganho de peso de cordeiros Morada Nova. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 3., 2018, Fortaleza.
- POHL DE SOUZA, F. P. et al. Ocorrência de três casos de tremor enzoótico dos ovinos. In: **IV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EM PEQUENOS RUMINANTES E CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS**, 2005, Curitiba. Anais... Curitiba: AVEPER, 2005.
- PRUSINER, S.B. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 95, n. 23, p. 13363-13383, 1998.
- RAMSHAW, J.A.; PETERS, D.E.; JONES, L.N. Ovine dermatosparaxis. **Aust. Vet. J.** v. 60, p. 149-151, 1983.
- SANTOS, C. R. et al. Genotipagem de polimorfismos no gene prnp em ovinos da raça Santa Inês no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 6, 2012.
- SCOTT, D.W. Color Atlas of Farm Animal Dermatology. Blackwell Publishing Professional, Ames, 2007. 252p.
- SLATE, J. Molecular evolution of the sheep prion protein gene, **Proc. Biol. Sci.**, v. 272, p. 2371–2377, 2005.
- SOTOMAIOR, C.S.; SOTOMAIOR, V.S.; MADEIRA, H.M; et al. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the State of Paraná, Brazil. **Anim. Genet.**, v. 39, p. 659-61, 2008.
- SOTOMAIOR, C. S. et al. Polimorfismos do gene da proteína priônica celular (PRNP) e distribuição da proteína priônica alterada (PrPSc) em rebanho com surto anterior de scrapie. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 31, n. 4, p. 1189-1199, Jul./ago. 2015.
- CFSPH - The Center for Food Security and Public Health. SPICKLER, A. R., 2016 Disponível em: <cfsph.iastate.edu/diseaseinfo/factsheets/>. Acesso em: 23/01/2023.
- SUCUPIRA, M.C.A.; ARCAUTE, M.R.; LACASTA, D. Enfermedades Congénitas y Hereditarias de la Piel de los Cordeiros. **I. Albéitar**, n. 128, p.36-37, 2009.
- THOMPSON, K.G.; BLAIR, H.T.; LINNEY, L.E.; et al. Inherited chondrodysplasia in Texel sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53, p. 208–212, 2005.
- THOMPSON, K.G.; DITTMER, K.E.; BLAIR, H.T.; et al. An outbreak of rickets in Corriedale sheep: evidence for a genetic aetiology. **New Zealand Veterinary Journal** v. 55, p. 137–142, 2007.
- VAASTRA, B.L.; HALLIDAY, W.D.; WAROPASTRAKUL, S. Dermatosparaxis in two white Dorper lambs. **N. Z. Vet. J.**, v. 59, p. 258-260, 2011.

- VACCARI, G.; SCAVIA, G.; SALA, M.; et al. Protective effect of the AT137RQ and ARQK176 PrP allele against classical *scrapie* in Sarda breed sheep. **Vet. Res.**, v. 40, n. 19, p. 11, 2009.
- VAN HALDEREN, A. & GREEN, J.R. Dermatosparaxis in White Dorper sheep. **J. S. Afr. Vet. Assoc.** v. 59, p. 45-46, 1988.
- VAN WEEREN-KEVERLING, B.A. & KOEMAN, J.P. A form of dermatosparaxis in a Texel lamb. **Tijdschr. Diergeneeskd.** v. 111, p. 173-177, 1986.
- ZHANG, L.; LI, N.; FAN, B.; et al. PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. **Anim Genet.**, v. 35, n. 6, p. 457-61, 2004.
- ZHAO, X.; DITTMER, K.E.; BLAIR, H.T.; et al. 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, p. 6, 2011.
- ZHAO, X.; ONTERU, S.K.; Piripi, S.; et al. In a shake of a lamb's tail: using genomics to unravel a cause of chondrodysplasia in Texel sheep. **Anim Genet.**, v. 43, n. 1, p. 9-18, 2012.
- ZHOU, H.; HICKFORD, J.G.; FANG, Q. A premature stop codon in the ADAMTS2 gene is likely to be responsible for dermatosparaxis in Dorper sheep. **Anim Genet**, v. 43, p. 471-3, 2012.
- ZOMERDIJK, F.; HIEMSTRA, S.J.; D'ARBAUMONT, M. et al. Quality Management Practices of Gene Banks for Livestock: A Global Review. **Biopreserv. Biobank.** v.18, p.244–253, 2020.

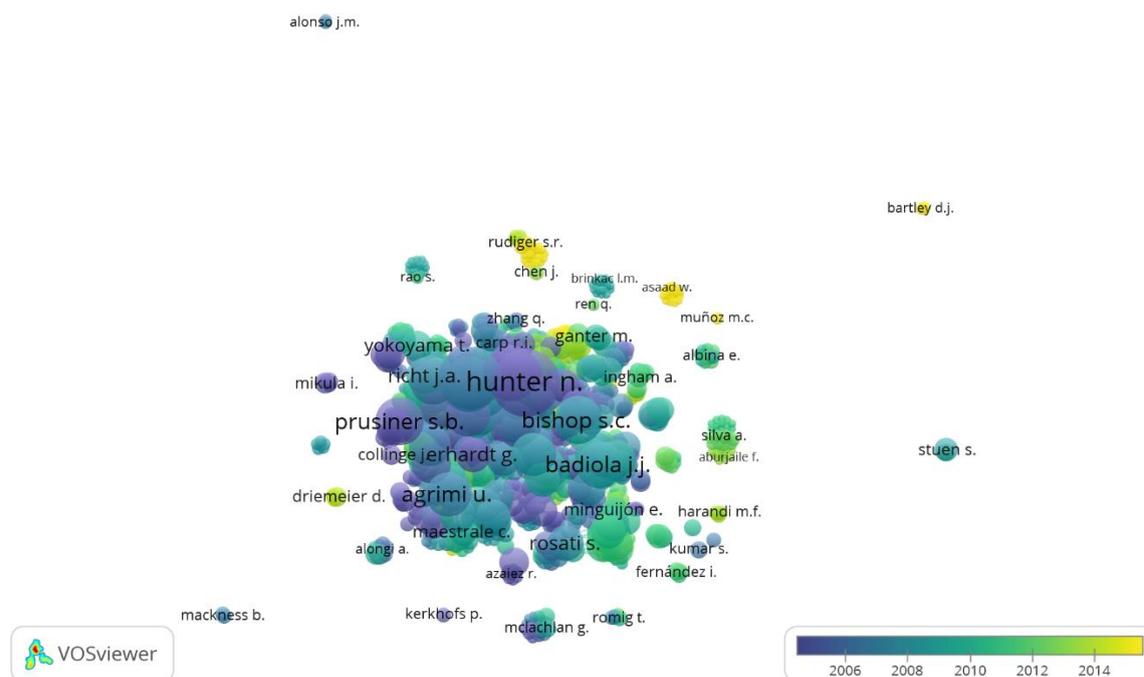
ANEXOS

Anexo A: Sequências ASP1, ASP2, LSP e STA dos SNPs relacionados a enfermidades em ovinos.

SNP	ASP1	ASP2	LSP	STA
ADAMTS2_421GT	TGCCACCCGCGTG G	TGCCACCCGCGTG T	CCCGCGACGTCTCCGA	CCACGGTGGAGTGG CA
DMP1_R1_45X	GTATCGTGGGCC CCT	GTATCGTGGGCC CCC	AGCTGACACCACACGATCC A	CCCTGCTCTCGCTG GT
FGFR3 - T1719A	CAGCTTGAAGAGC TCCTCCA	CAGCTTGAAGAGC TCCTCCT	GGGCTCGCCGTACCCT GCCAACAAATTAACATATG	GCGGTGGCCTTCCT TC
MTX2_rs4_23802184	AGACTACTGCAGG TAAAATGGCT	AGACTACTGCAGG TAAAATGGCC	TATATACCTAAGAGTCTTC A	TCACCCAACTTGATC CTTAAGAGA
OAR_PRN_P_A136T	GTGGCTACATGCT GGGAAGTA	TGGCTACATGCTG GGAAGTG	GTTGGGGTAACGGTACAT GTTTTCA	CCTTGGTGGCTACA TGCT
OAR_PRN_P_A136V	GCTACATGCTGGG AAGTGC	GGCTACATGCTGG GAAGTGT	AGTAATGGTCCTCATAGTC ATTGCCAAA	CCTTGGTGGCTACA TGCT
OAR_PRN_P_L141F	CTCATAGTCATTGC CAAAACGTGTAAG	CCAAAACGTGTAA A	CTCATAGTCATTG TGCTGGGAAGTGCCACGA	ATGTTTTACGATA GTAACGGTCC
OAR_PRN_P_L237P	GGGGGCAAGTGTG ATCCC	GGGGGCAAGTGT GATCCT	CAGGAAGGTTGCCCTATC CTA	CCCAGGCTTATTACC AAAGGG
OAR_PRN_P_M112I	CCAGTAAGCCAAA AACCAACACC	CCAGTAAGCCAAA AACCAACACG	CCAGTAAGCCAAA ACCACTGCTCCAGCTGCA	CACAGTCAGTGGAA CAAGCC
OAR_PRN_P_M112T	CCCAGTAAGCCAA AAACCAACAC	CCCAGTAAGCCAA AAACCAACAT	CCCAGTAAGCCAA ACCACTGCTCCAGCTGCA	GTGGAACAAGCCCA GTAAGC
OAR_PRN_P_M137T	CCAAAATGTATAA GAGGCCTGTTCG	CCAAAATGTATAA GAGGCCTGTTC	CCAAAATGTATAA C	GACCCTTGGTGGCTACATG GTAATGGTCCTCAT AGTCATTGCC
OAR_PRN_P_N176K	TTGACACAGTCAT GCACAAAGTTT	TGACACAGTCATG CACAAAGTTG	ACATGTACCGTTACCCAA CCA	TGTGTTGCTTGACT GTGATGTT
OAR_PRN_P_P168L	CCCAACCAAGTGT ACTACAGACC	CCCAACCAAGTGT ACTACAGACT	CTTGACTGTGATGTTGACA CAGTCAT	TGAAAACATGTACC GTTACCCC
OAR_PRN_P_Q171H	GTGTACTACAGAC CAGTGGATCAG	GTGTACTACAGAC CAGTGGATCAT	GCTTGACTGTGATGTTGAC ACA	GTACCGTTACCCCA ACCAAG
OAR_PRN_P_Q171K	CAAGTGTACTACA GACCACTGGATA	CAAGTGTACTACA GACCACTGGATC	GCTTGACTGTGATGTTGAC ACA	CATGTACCGTTACCC CAACC
OAR_PRN_P_Q171R	AGTGTACTACAGA CCAGTGGATCA	GTGTACTACAGAC CAGTGGATCG	TGTTGCTTGACTGTGATGT TGACAC	TGTACCGTTACCCCA ACCA
OAR_PRN_P_R154H	CAATGACTATGAG GACCGTACTATCA	GACCGTACTATC G	GATCCACTGGTCTGTAGTA CACT AATGAAAAAAGTTACTGTT	AGCAGGCCTCTTAT ACATTTTGG
OAR10_29_065568	TGGAATCTCAGCA TTTCTCTGAATCA CTGATTTCCAACCTG	GGAATCTCAGCAT TTCTCTGAATCG TGATTTCCAACCTG	CAAAACTAAAAGATAATAG AA	GGCCACTTTCGATG TGGAA
OAR10_29_469450	AGTTACTATCTCTC TA	AGTTACTATCTCTC TG	CCTGTCATTGAAGCTTCTTC ATAACTAGGA	AAGTCCATCATTGTC CTGATTTCC
OAR10_29_546872	ACTGACTTGATTCT GACCTAATGCT	ACTGACTTGATTC TGACCTAATGCA	TCATCAATACCCTGAATGT CCCCG	CACAGGTCCCTCTA AATTCTTTAACTG
OAR10_29	ACTTGAAGTGATC	CTTGAAGTGATCC	CCTCAACTTTATCTAAAGA	ACAGTTGTAAGAAA

907137	CATTTTCCAGACA	ATTTTCCAGACG	GTCCAGGCA	TAGAAACTGAAGT GA
OAR10_29	GTTCTTTCTCTCCA	TTCTTTCTCTCCAC		GCATCCCTCTCATT
978908	CAGCACTTACTA	AGCACTTACTC	CGGGCAGTAGGCAGACCT	TGTGTTCT
OAR10_30	CTGGTCCCATAAG	TGGTCCCATAAGA	ACCTTCAAGTAAAGTAAAA	ATTGTTTCAACCCAA
241199	AGTGAACCTT	GTGAACCTC	GTAACCCCAAGT	GTAACCTGGT
PRNP_rs16	ACGATAGTAACGG	CGATAGTAACGGT		GGGTAACGGTACAT
0575100	TCCTCATAGTCAT	CCTCATAGTCAC	GTGCCATGAGCAGGCCTC	GTTTTACAG
PRNP_rs41	TGTGTCAACATCAC	TGTGTCAACATCA		CCAGAACAACCTTG
211682	AGTCAAGCA	CAGTCAAGCT	TCTCCCCCTTGGTGGTGG	TGCATGACT
rs4057332	CAAAATTCCAGAG	CAAAATTCCAGAG	TGGTTTGAGGGTAGCAATT	GGTGAACCCAGGCT
49	AATGGCATCCG	AATGGCATCCA	CTT	TAATGCAA
	TCTTTCCTCGGTGT	TCTTTCCTCGGTGT		TGCTCCTGATGCTGT
s26428	GTGAAA	GTGGAAG	TCCTGTGTCCAGTGGCCC	GGT
	TCCGGCCGCTACA	TCCGGCCGCTACA	GCACTCAGTGATGTGGGC	CCTCTCTCTGTGCT
s45016	ACATT	ACATC	AA	AGATGC
	GCCATGTCCAGTCT	CCATGTCCAGTCT		GAGCTCACCATTGA
s57500	TCACAACAATA	TCACAACAATG	CTGGGCCCTGGGTTCTCA	GCCA
	GCAATCTTGTTTGC	GCAATCTTGTTTG	GGAAAGAAGGCCACTTGG	CTGTACCCTGACATT
s68983	TCTCCGT	CTCTCCGTC	CA	GGCTG
	CTCAGCCTGTGAG	TCAGCCTGTGAGA	CAGGCAAGCAAGATGACA	CTCCAGCTTAAACT
s73573	ACTTTCT	CCTTTC	GCA	GCCACC
SLC13A1_r				
s40144113	GCACAAAAGGATT	GCACAAAAGGATT	CATGCTGGGTTACACCCA	CAACATCCATAGAA
2	GCTCTGAGAAT	GCTCTGAGAAG	C	AAATGGAATCTGC

Anexo B – Mapa dos principais grupos de autores na literatura mundial sobre doenças genéticas em ovinos ao longo dos últimos anos.



CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS ASSOCIADOS À CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO PARA A SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE SNPS ASSOCIADOS À CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO PARA A SELEÇÃO DE OVINOS DE DIFERENTES RAÇAS NO BRASIL, Camila Souza Rodrigues, Mestranda e Concepta McManus, PhD, Brasília – DF

Otimizar a qualidade da produção é um dos maiores desafios da ovinocultura brasileira. Isso pode ser feito através de programas de seleção assistida por marcadores que visem aprimorar nos rebanhos importantes características econômicas, como a prolificidade, a cor de pelagem (lã) e qualidade da carne dos animais. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um painel reduzido de SNPs associados a características de produção para a seleção de ovinos de diferentes raças presentes no Brasil. Os SNPs selecionados foram genotipados através da plataforma Fluidigm. Foi realizada a extração de DNA de 1040 amostras de sangue de animais de 15 raças de importância para a ovinocultura nacional, sendo elas: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Somalis Brasileira, Bergamácia Brasileira, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel e Barriga Negra. Amostras de sêmen (N = 112) de algumas dessas raças mantidas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) também foram incluídas no estudo. Com base nos dados de genotipagem obtidos, foram estimadas as frequências alélicas e haplotípicas para os marcadores associados as características de interesse. Foram comparados ainda, os resultados obtidos nas diferentes populações da raça Santa Inês, com o objetivo de verificar a existência de diversidade alélica entre elas. Além disso, dados de genotipagem de amostras em comum genotipadas com o BeadChip Illumina OvineSNP 600K, que é considerada uma tecnologia robusta de genotipagem, foram comparados com os dados obtidos aqui. No total foram genotipados 51 SNPs, sendo 27% dos SNPs falharam. Dos 73% bem-sucedidos, 15 foram monomórficos. Em painéis futuros estes marcadores podem ser

excluídos, otimizando assim os resultados. No loco *FecG^E* as frequências do alelo G foram altas nas raças Barriga Negra (0,756) e Morada Nova (0,706), sendo que este alelo também está presente nas raças Bergamácia Brasileira, Pantaneira, Rabo Largo, Santa Inês e Somalis Brasileira, estando ausente nas raças lanadas. As mutações p.M73K e p.D121N no gene MC1R foram genotipadas com sucesso em todas as raças. Foram definidos três haplótipos (H1, H2 e H3). Na deleção *D⁵* do gene ASIP, o alelo da inserção “AGGAA” foi mais frequente na maioria das raças. Neste estudo foram genotipadas com sucesso outras importantes mutações relacionadas a cor de pelagem, sendo necessário mais estudos para compreender seu papel na interação com outros importantes genes ligados a cor de pelagem. Foi observado ainda semelhanças entre as populações de Santa Inês do BBGA, CNPC e CPATC, o que pode ser explicado pelo fluxo gênico entre essas populações. Ficou evidente que a tecnologia Fluidigm é robusta e financeiramente viável para painéis de baixa densidade que serão utilizados para programas de seleção assistida, manejo de rebanhos e bancos genéticos.

Palavras-chave: SNPs, *Ovis aries*, *Growth Differential Factor 9*, *Melanocortin 1 Receptor*.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A PANEL OF SNPS ASSOCIATED WITH PRODUCTION CHARACTERISTICS FOR THE SELECTION OF SHEEP FROM DIFFERENT BREEDS IN BRAZIL, Camila Souza Rodrigues, Master's student and Concepta McManus, PhD, Brasília – DF

One of the biggest challenges of Brazilian sheep farming is to optimize production quality. This can be done through genomic selection programs that aim to improve important characteristics of economic importance in herds, such as prolificacy, coat color and meat quality. The objective of this work was to develop and validate a reduced panel of SNPs associated with production traits for the selection of sheep from different breeds present in Brazil. The SNPs selected were genotyped through the Fluidigm platform. DNA was extracted from 1040 blood samples from animals of 15 important breeds for national sheep farming, namely: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Brazilian Somali, Brazilian Bergamasca, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel and Barriga Negra. Semen samples (N = 112) of these breeds maintained at the Brazilian Animal Germplasm Biobank (BBGA) were also included in the study. Based on the genotyping data obtained, allele and haplotype frequencies were estimated for the markers associated with the traits of interest. The results obtained in different populations of the Santa Inês breed were also compared, with the objective of verifying the existence of allelic diversity between them. In addition, genotyping data from common samples genotyped with the BeadChip Illumina OvineSNP 600K, which is considered a robust genotyping technology, was compared with the data obtained here. A total of 51 SNPs were genotyped, with 27% of them being excluded. Of the 73% successful SNPs, 15 were monomorphic. In future panels these markers can be excluded, thus optimizing the results. At the *FecGE* locus, the frequencies of the G allele were higher in the Barriga Negra (0.756) and Morada Nova (0.706)

breeds, and this allele is also present in the Brazilian Bergamasca, Pantaneira, Rabo Largo, Santa Inês and Brazilian Somalis breeds. Loci p.M73K and p.D121N in the MC1R gene were successfully genotyped in all breeds. Three haplotypes (H1, H2 and H3) were defined. In the D^5 deletion of the ASIP gene, the insertion allele "AGGAA" was more frequent in most breeds. In this study, other important SNPs related to coat color were successfully genotyped, and further studies are needed to understand their role in the interaction with other important genes linked to coat color. Similarities were observed between populations of Santa Inês from the BBGA, CNPC and CPATC, which can be explained by the gene flow between them. Finally, it was possible to conclude that the Fluidigm technology is a reliable, useful and financially viable tool for studies that aim to optimize genetic selection programs with sheep in Brazil.

Keywords: SNPs, *Ovis aries*, Growth Differentiation Factor 9, Melanocortin 1 Receptor.

1. INTRODUÇÃO

A criação de ovinos no Brasil tem se tornado uma importante atividade econômica, com o crescimento do efetivo de animais ocorrendo principalmente na região Nordeste do país (IBGE, 2021). Existem 27 raças de ovinos registradas no país pela Associação dos Criadores de Ovinos (ARCO). As raças naturalizadas ou localmente adaptadas são separadas em lanadas (Crioula Lanada, Bergamácia Brasileira e Pantaneira) e deslanadas (Santa Inês, Morada Nova, Somalis Brasileira, Barriga Negra e Rabo Largo). Outras raças como Suffolk, Hampshire, Texel, Dorper, Dâmara, Corriedale e Ile de France são classificadas como raças comerciais (McManus et al., 2013).

Atualmente, o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) é um dos principais responsáveis por garantir a variabilidade genética e conservação das raças ovinas brasileiras (Paiva et al., 2019). Para que a ovinocultura continue crescendo, além da conservação dos recursos genéticos ovinos, é necessário otimizar a qualidade da produção animal, o que pode ser feito através de melhoramento genético (McManus et al., 2020). Uma das principais características de importância econômica em programas de melhoramento animal é a capacidade reprodutiva, que pode ser medida por fertilidade, fecundidade e prolificidade (número de cordeiros por parto) (Abdoli et al., 2016).

Estudos anteriores identificaram três importantes genes candidatos relacionados à prolificidade em ovinos, estes são membros da superfamília do fator transformador de crescimento beta (TGF- β). O *Bone Morphogenetic Protein 15* (BMP15) ou FecX (Gene da Fecundidade X), que tem papel crucial na proliferação e diferenciação das células da granulosa durante o desenvolvimento folicular ovariano (Galloway et al., 2000; Crawford et al., 2012). O *Growth Differentiation Factor 9* (GDF9) ou FecG (Gene da Fecundidade G), que possui influência direta nas células somáticas circundantes, particularmente nas células da granulosa, do cúmulo e da teca (Hanrahan et al., 2004; Otsuka et al., 2011). E por último, o *Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B* (BMPRI1B) ou FecB

(Gene da Fecundidade B), que tem efeito aditivo no desenvolvimento dos folículos e células granulosas do ovário. (Chu et al., 2005; Castro et al., 2016; Hanrahan et al., 2004; Davis, 1982; Mulsant et al., 2003).

Além da prolificidade, outra importante característica nos programas de melhoramento ovino é a cor de pelagem dos animais. Em mamíferos, a característica de coloração de pelagem é determinada pela interação de múltiplos genes (Bennett e Lamoreux, 2003). A variabilidade de coloração ocorre devido a atividade de células especializadas (melanócitos), que produzem dois tipos de pigmentos: eumelanina e feomelanina, determinando as colorações preto/marrom e vermelho/amarelo, respectivamente. A quantidade desses dois tipos de melanina na pelagem dos animais é regulada e controlada por dois *loci* principais (*Agouti* e *Extension*) (Searle, 1968). O *locus Agouti* codifica o gene *Agouti Signalin Protein* (ASIP) (Bultman et al., 1992), e o *locus Extension* codifica o para o *Melanocortin 1 Receptor* (MC1R) (Robbins et al., 1993).

Outro gene importante na variação de cor de pelagem em ovinos já descrito na literatura, é a *Tyrosinase-Related Protein 1* (TYRP1), identificado como o responsável pela variação em cor de pelagem em uma população de ovinos da raça Soay (Gratten et al., 2007). Nesse gene foram reportadas algumas mutações interessantes, sendo elas G869T (Gratten et al., 2007), G192C e C462T (Deng et al., 2008) e *rs429648229* (J. McEwan – dados não publicados). Adicionalmente, outras regiões no genoma ovino foram associadas a característica de cor de pelagem, como a mutação *Raly_rs401457425*, no ASIP e as mutações *MITF_rs414386339* e *CoatC_rs429090866*, no gene *Microphthalmia Transcription Factor* (MITF) (Li et al., 2014).

Outra característica de produção de grande importância nos programas de melhoramento genético ovino é a qualidade da carne. Para essa característica, um marcador foi reportado na literatura em ovinos Texel; *MSTN_6723GA* se localiza no gene da miostatina e está associado a maior massa muscular e volume de carne em relação à gordura depositada na carcaça após o abate do animal (Clöp et al., 2006). É importante ressaltar que diferente do que ocorre em estudos com bovinos, na ovinocultura ainda não há fortes evidências de outros marcadores associados a característica de rendimento de carcaça e qualidade da carne na literatura. Ainda, foi incluído no painel o SNP mais difundido na literatura até o momento localizado no Cromossomo Y de ovinos; AY604734.2g.67A>G, denominado aqui de *Y_oYI*, mapeado na região promotora 5' do gene ovino *Sex Determining Region Y* (SRY), este SNP permite estudar a linhagem materna e pode também ser usado em testes de sexagem e parentesco (Meadows et al., 2004).

Painéis de SNPs de baixa densidade possuem a vantagem de genotipar animais para características específicas, de forma rápida, econômica e eficiente (Raoul et al., 2017; Marina et al., 2022). O objetivo desse estudo é validar um painel reduzido de SNPs que contém marcadores associados a características de interesse para a ovinocultura nacional, como a prolificidade, qualidade da carne e a cor de pelagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem Animal

O presente estudo utilizou 1.040 amostras de sangue de ovinos de 15 raças, mantidos em Núcleos de Conservação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) distribuídos pelo país. As raças utilizadas no estudo foram: Santa Inês, Morada Nova, Crioula Lanada, Rabo Largo, Somalis Brasileira, Bergamácia Brasileira, Corriedale, Ile de France, Pantaneira, Dorper, Damara, Suffolk, Hampshire, Texel e Barriga Negra. Amostras de sêmen (N = 112) de algumas dessas raças mantidas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) também foram incluídas no estudo.

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de purificação Puregene (Kit Gentra Puregene®) para as amostras de sangue e sêmen. A verificação da qualidade do DNA das amostras foi realizada de duas maneiras. Inicialmente, foi utilizado gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando padrões lambda de 200 ng/μg, 100 ng/μg e 50 ng/μg para comparação. Além disso, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro NanoDrop Thermo Scientific (NanoDrop™ 8000. Thermo Fisher Scientific, 2010 <https://www.thermofisher.com/>) para determinação de contaminantes (proteínas e reagentes químicos).

2.2 Genotipagem das Amostras

No presente estudo, a metodologia de genotipagem utilizada foi a Fluidigm EP1™ (Fluidigm, San Francisco, CA, EUA). Resumidamente, os ensaios Fluidigm® SNP Type™ foram projetados para 96 SNPs selecionados previamente com a ferramenta Fluidigm D3™, de acordo com as instruções e regras do fabricante descritas em:

(<https://d3.fluidigm.com/>). Após verificação de qualidade, 90 ng de DNA de cada amostra foram utilizados para genotipagem. Os dados de genotipagem foram gerados de acordo com os protocolos padrão fornecidos pela Fluidigm para uso com a plataforma EP1. Cada amostra foi submetida a pré-amplificação com um conjunto de oligonucleotídeos *primer* locus-específico (*Loco-Specific Primer - LSP*) e *primer* de amplificação alvo-específico (*Specific Target Amplification - STA*) para os SNPs testados. O produto amplificado diluído foi carregado em 12 placas IFCs 96.96 Dynamic Array™ (Fluidigm, San Francisco, CA, EUA), com corante de referência ROX e ensaios contendo *primers* alelo-específicos (*Allele-Specific Primers – ASP*) e oligonucleotídeos LSP para cada SNP, de acordo com as instruções do fabricante. As sequências ASP, LSP e STA estão disponíveis na tabela anexa A. Os ensaios foram conduzidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). Os dados de imagem de fluorescência de endpoint foram adquiridos no EP1 Fluidigm imager, e as chamadas de genótipo foram obtidas pelo Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software. Os marcadores utilizados no estudo e suas referências podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. SNPs e INDELS selecionados na literatura associados a características de importância econômica para a ovinocultura.

Gene/Região	Marcador	Posição	SNP	Referência
BMPR1B	<i>BMPR1B_Boroala_FecBB</i>	exon 8	A/G	Souza <i>et al.</i> (2001)
	<i>BMPR1B_SNP_38377_g192a</i>	exon 2	C/T	Chu <i>et al.</i> (2011)
	<i>BMPR1B_T1019C</i>	exon 7	T/C	Lacerda <i>et al.</i> (2016)
	<i>BMPR1B_A104G</i>	exon 1	A/G	Lacerda <i>et al.</i> (2016)
	<i>BMPR1B_rs418841713</i>	exon 8	T/C	Illumina Ovine HD (ISGC)
	<i>BMPR1B_T1043C</i>	exon 7	T/C	Chu <i>et al.</i> (2011)
	<i>BMPR1B_rs428753381</i>	exon 2	C/T	Illumina Ovine HD (ISGC)
BMP15	<i>BMP15_Galway_FecXE_B2</i>	exon 2	C/T	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>BMP15_Belclare_FecXB_B4</i>	exon 2	G/T	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>BMP15_Inverdale_FecXI</i>	exon 2	T/A	Galloway <i>et al.</i> (2000)
	<i>BMP15_Hanna_FecXH</i>	exon 2	C/T	Galloway <i>et al.</i> (2000)
	<i>BMP15_Olkuska_FecXO</i>	exon 2	A/C	Demars <i>et al.</i> (2013)
	<i>BMP15_Grivette_FecXGr</i>	exon 2	C/T	Demars <i>et al.</i> (2013)
	<i>BMP15_Lacaune_FecXL</i>	exon 2	G/A	Bodin <i>et al.</i> (2007)
	<i>BMP15_B1_1118B</i>	exon 1	CTT/---	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>BMP15_FecXBar</i>	exon 1	G/T	Lassoued <i>et al.</i> (2017)
<i>BMP15_rs55628000</i>	exon 2	C/T	Amini <i>et al.</i> (2018)	
GDF9	<i>GDF9_Embrapa_FecGE</i>	exon 2	G/T	Silva <i>et al.</i> (2011)
	<i>GDF9_Iceland_FecII_Thoka</i>	exon 2	A/C	Nicol <i>et al.</i> (2009)
	<i>GDF9_3655</i>	exon 2	G/A	Castro <i>et al.</i> (2006)
	<i>GDF9_3761G</i>	exon 2	G/A	Castro <i>et al.</i> (2006)
	<i>GDF9_3776G</i>	exon 2	G/C	Castro <i>et al.</i> (2006)
	<i>GDF9_426882553</i>	exon 2	A/G	Illumina Ovine HD (ISGC)
	<i>GDF9_G1_2039G</i>	exon 1	G/A	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>GDF9_G3</i>	exon 2	G/A	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>GDF9_G4</i>	exon 2	G/A	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>GDF9_G5_nearFecGEII</i>	exon 2	A/G	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
<i>GDF9_G6_nearFecGEI</i>	exon 2	G/A	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)	

	<i>GDF9_G7</i>	exon 2	G/A	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>GDF9_Han</i>	exon 2	G/T	Chu <i>et al.</i> (2011)
	<i>GDF9_highfertility_FecGH_G8</i>	exon 2	C/T	Hanrahan <i>et al.</i> (2004)
	<i>GDF9_OMN_3763G</i>	exon 2	A/T	Lacerda <i>et al.</i> (2016)
	<i>GDF9_rs40376560</i>	exon 2	G/T	Illumina Ovine HD (ISGC)
	<i>GDF9_rs425223128</i>	exon 2	C/T	Illumina Ovine HD (ISGC)
	<i>GDF9_rs426065119</i>	exon 2	G/A	Illumina Ovine HD (ISGC)
	<i>GDF9_Vacaria- FecXV</i>	exon 2	C/T	Souza <i>et al.</i> (2014)
	<i>ASIP_G5051C</i>	exon 4	G/C	Norris and Whan (2008)
	<i>ASIP_T5172A</i>	exon 4	T/A	Norris and Whan (2008)
ASIP	<i>ASIP_D5_100-105</i>	exon 2	GAAAG/-	Norris and Whan (2008)
	<i>ASIP_D9_10-19</i>	exon 2	AGCCGCCT/-	Norris and Whan (2008)
	<i>Raly_rs401457425</i>	Região intergênica	A/G	Li <i>et al.</i> (2014)
MC1R	<i>MC1R_D121N</i>	exon 1	G/A	Hepp <i>et al.</i> (2012)
	<i>MC1R_M73K</i>	exon 1	T/A	Hepp <i>et al.</i> (2012)
	<i>TYR_C462T</i>	exon 1	C/T	Deng <i>et al.</i> (2008)
TYRP1	<i>TYR_G192C</i>	exon 1	G/C	Deng <i>et al.</i> (2008)
	<i>TYR_G869T</i>	exon 4	G/T	Gratten <i>et al.</i> (2007)
	<i>TYR_rs429648229</i>	exon 2	C/T	Illumina Ovine HD (ISGC)
MITF	<i>MITF_rs414386339</i>	Região intergênica	C/T	Illumina Ovine HD (ISGC)
	<i>CoatC_rs429090866</i>	Região intergênica	A/G	Illumina Ovine HD (ISGC)
GDF8	<i>MSTN_6723GA</i>	Região 3' upstream	G/A	Clop <i>et al.</i> (2006)
SRY	<i>Y_oY1</i>	Região promotora 5'	A/G	Meadows <i>et al.</i> (2004)

2.3 Análise de dados

Foram conduzidas análises de clusters para definir as classes de genótipos para cada SNP, e o *confidence threshold* aplicado para cada genótipo foi $>0,90$. A decisão de utilizar esse valor, acima do recomendado pelo fabricante Fluidigm ($>0,75$), levou em conta a existência de inconsistência de genótipos entre amostras referências genotipadas com os BeadChips da Illumina, quando em *confidence threshold* mais baixos. Amostras e marcadores, em lotes de 96, passaram por controle de qualidade utilizando o software SNP & Variation Suite v8.9.1 – SVS (Golden Helix, Bozeman, MT, www.goldenelix.com). Foram eliminadas amostras com *call rate* $< 0,80$ e marcadores com *call rate* $< 0,75$. As frequências alélicas e haplotípicas foram estimadas pelos softwares GenAIEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) e Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) respectivamente. Marcadores monomórficos foram excluídos da análise de frequências de haplótipos.

Para determinar a reprodutibilidade da metodologia Fluidigm, foram utilizados os genótipos dos loci *MITF_rs414386339*, *BMP1B_SNP_38377_G192A* e *BMP15_Inverdale_FecXI* comparando animais referência entre Fluidigm e Illumina® OvineSNP 600K BeadChip (N = 16). O teste de Friedman (Friedman, 1937) foi aplicado para determinar se as diferenças nos genótipos entre as metodologias foram estatisticamente significativas.

As populações da raça Santa Inês foram separadas de acordo com a localização geográfica do rebanho (Tabela 2), e foi realizado o teste de qui-quadrado ($p < 0,05$) para determinar se houve significância estatística nas diferenças de frequências alélicas entre as populações. Ambos os testes estatísticos foram performados no software SAS (*Statistical Analysis Software Institute, Cary, North Carolina*).

Tabela 2. Localização do rebanho e número amostral de diferentes populações de ovinos da raça Santa Inês.

População de Ovinos Santa Inês	Localização	N
Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA)	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil	15
Embrapa Caprinos e Ovinos (CNPC)	Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE, Brasil	118
Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA)	Empresa Bahiana de Desenvolvimento Agrícola, Salvador-BA, Brasil	2
Embrapa Meio-Norte (CPAMN)	Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, Brasil	15
Embrapa Tabuleiros Costeiros (CPATC)	Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, Brasil	59
Gaasa e Alimentos Ltda (GAASA)	GAASA Alimentos, Inhumas-GO, Brasil	11
Universidade de Brasília (UnB-DF)	Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil	27

3. RESULTADOS

3.1 Controle de Qualidade

Nas análises de prolificidade, os SNPs *BMP15_FecXBar101*, *BMP15_Galway_FecXE_B2*, *BMP15_Hanna_FecXH*, *BMP15_rs55628000*, *BMPR1B_A104G*, *GDF9_Han*, *GDF9_Iceland_FecII_Thoka* e *GDF9_rs426065119* apresentaram *call rate* <0,75 e, portanto, não tiveram as frequências alélicas e haplotípicas estimadas.

Além disso, alguns SNPs foram monomórficos e por isso não tiveram as frequências haplotípicas estimadas. No gene *BMP15* estes foram: *BMP15_Belclare_FecXB_B4* (GG), *BMP15_Grivette_FecXGr* (CC), *BMP15_Inverdale_FecXI* (TT), *BMP15_Lacaune_FecXL* (GG), *BMP15_Olkuska_FecXO* (AA). No gene *BMPR1B* estes foram: *BMPR1B_Boroola_FecBB* (AA), *BMPR1B_rs418841713* (TT), *BMPR1B_T1019C* (TT), *BMPR1B_T1043C* (TT). No gene *GDF9* estes foram: *GDF9_3761G* (GG), *GDF9_426882553* (GG), *GDF9_G7* (GG), *GDF9_OMN_3763G* (AA) e *GDF9_Vacaria-FecXV* (CC). Ainda no gene *BMPR1B*, os SNPs *BMPR1B_rs428753381* e *BMPR1B_SNP_38377_G192A* estão localizados na mesma região no exon 2 do gene, e indicam a mesma mutação. Nesse caso, optamos por analisar o SNP *BMPR1B_SNP_38377_G192A*, pois esse apresentou melhor *call rate*.

O marcador *Y_oYI* foi eliminado, por não apresentar resultados interpretáveis e esperados na genotipagem, com amostras com genótipos heterozigotos, quando estas deveriam apenas apresentar genótipos homozigotos devido ao marcador estar localizado na porção não pareada do cromossomo Y.

O marcador *MSTN_6723GA* no gene da miostatina, associado a maior massa muscular e volume de carne em relação à gordura na carcaça também apresentou *call rate* <0,75, sendo eliminado das análises.

Para a característica de cor de pelagem, os SNPs *ASIP_G5051C*, *ASIP_T5172A*, *TYR_G192C* e *TYR_G869T* foram eliminados por apresentar *call rate* < 0,75. No gene *MC1R* todos os SNPs passaram no controle de qualidade. Além dos SNPs excluídos com *call rate* <0,75, o SNP *ASIP_D9_10-19* ficou de fora das análises de frequências de haplótipos, pois é monomórfico.

Após a aplicação dos filtros de controle de qualidade, das 1152 amostras genotipadas, restaram 845 (35%) com *call rate* >0,80 (Tabela 3).

Tabela 3. Número amostral por raça ovina após controle de qualidade (*call rate* < 0,80).

RAÇA/POPULAÇÃO	SIGLA	N
Banco Brasileiro de Germoplasma Animal	BBGA	88
Barriga Negra	OBN	43
Bergamácia Brasileira	OB	39
Corriedale	OC	29
Crioula Lanada	OCL	44
Dâmara	ODA	10
Dorper	ODO	18
Hampshire	OH	14
Ile de France	OIF	39
Morada Nova	OMN	129
Pantaneira	OPT	46
Rabo Largo	ORL	34
Santa Inês	OSI	233
Somalis Brasileira	OS	37
Suffolk	OSUF	28
Texel	OT	14

3.2 SNPs relacionados a prolificidade em ovinos

Como mencionado anteriormente, a maioria dos SNPs do gene BMP15 foram monomórficos ou apresentarem *call rate* <0,75. Por isso, apenas o SNP *BMP15_B1_1118B* será descrito aqui, sendo que neste marcador, o alelo deletado foi o mais frequente em 9 das 16 populações do estudo. A inserção CTT foi mais frequente nas raças Barriga Negra (0,616), Crioula Lanada (0,593), Hampshire (0,821), Rabo Largo (0,544), Santa Inês (0,517), Suffolk (0,643) e Texel (0,714). Com isso é notável o alto polimorfismo desse loco nas raças estudadas (Tabela 6).

De maneira similar ao gene BMPR1B, a maioria dos SNPs no gene BMPR1B não passaram no controle de qualidade ou foram monomórficos, restando o SNP *BMPR1B_SNP_38377_G192A* a ser descrito aqui, neste marcador o alelo C foi o mais frequente em todas as populações estudadas (Tabela 6).

O gene GDF9 foi o gene com o maior número de marcadores polimórficos neste estudo. Nesse gene, o SNP *GDF9_G1_2039G* apresentou o alelo G como mais frequente na maioria das populações, com exceção da raça Texel, que teve

frequência balanceada entre os dois alelos G e A (0,500 e 0,500), respectivamente. No SNP *GDF9_G3* o alelo G foi o mais frequente na maioria das populações, com exceção das raças Dorper, Ile de France e Suffolk que tiveram maior frequência para o alelo A, sendo 0,778, 0,581 e 0,560 respectivamente. O marcador *GDF9_rs40376560* possui o alelo T em maior frequência na maioria das populações, exceto nas raças Barriga Negra e Morada Nova, onde o alelo G foi o mais frequente com 0,788 e 0,708 respectivamente. No SNP *GDF9_G5_nearFecGEII* o alelo A foi o mais frequente na maioria das populações, exceto na raça Dorper, onde a frequência do alelo G é ligeiramente maior (0,528). SNP *GDF9_G6_nearFecGEI* as frequências alélicas foram muito similares as do SNP *GDF9_G5_nearFecGEII*, sendo que o alelo G foi o mais frequente na maioria das populações, exceto na raça Dorper, onde o alelo A foi o mais frequente com 0,528 (Tabela 4).

O SNP *GDF9_Embrapa_FecGE* o alelo mutante associado à alta taxa de partos duplos, G, foi o mais frequente nas raças Barriga Negra (0,756) e Morada Nova (0,706), por outro lado as raças Corriedale, Crioula Lanada, Dorper, Damara, Ile de France, Hampshire, Suffolk e Texel são monomórficas para o alelo selvagem T (Figura 1).

Tabela 4. Frequências alélicas de 13 SNPs localizados nos genes BMP15, BMPR1B e GDF9, relacionados a prolificidade em ovinos.

Loco	Alelo	População/Raças ¹															
		BBGA	OBN	OB	OC	OCL	ODA	ODO	OH	OIF	OMN	OPT	ORL	OSI	OS	OSUF	OT
<i>BMP15_B1_1118B</i>	CTT	0,405	0,616	0,192	0,379	0,593	0,150	0,194	0,821	0,282	0,279	0,424	0,544	0,517	0,365	0,643	0,714
	---	0,595	0,384	0,808	0,621	0,407	0,850	0,806	0,179	0,718	0,721	0,576	0,456	0,483	0,635	0,357	0,286
<i>BMPR1B_SNP_38377_G192A</i>	C	0,989	0,988	0,962	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,974	1,000	0,935	1,000	0,943	1,000	1,000	1,000
	T	0,011	0,012	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	0,065	0,000	0,057	0,000	0,000	0,000
<i>GDF9_G1_2039G</i>	A	0,023	0,000	0,051	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,205	0,012	0,076	0,000	0,009	0,000	0,179	0,500
	G	0,977	1,000	0,949	0,889	1,000	1,000	1,000	1,000	0,795	0,988	0,924	1,000	0,991	1,000	0,821	0,500
<i>GDF9_G3</i>	A	0,232	0,035	0,111	0,413	0,372	0,450	0,778	0,429	0,581	0,100	0,348	0,279	0,193	0,270	0,560	0,400
	G	0,768	0,965	0,889	0,587	0,628	0,550	0,222	0,571	0,419	0,900	0,652	0,721	0,807	0,730	0,440	0,600
<i>GDF9_rs40376560</i>	G	0,380	0,788	0,128	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,708	0,067	0,446	0,362	0,297	0,000	0,000
	T	0,620	0,213	0,872	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,292	0,933	0,554	0,638	0,703	1,000	1,000
<i>GDF9_G4</i>	A	0,017	0,000	0,014	0,138	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,004	0,076	0,000	0,009	0,000	0,089	0,231
	G	0,983	1,000	0,986	0,862	1,000	1,000	1,000	1,000	0,875	0,996	0,924	1,000	0,991	1,000	0,911	0,769

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL- Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel.

Tabela 4 Cont. Frequências alélicas de 13 SNPs localizados nos genes BMP15, BMPR1B e GDF9, relacionados a prolificidade em ovinos.

Loco	Alelo	População/Raças ¹															
		BBGA	OBN	OB	OC	OCL	ODA	ODO	OH	OIF	OMN	OPT	ORL	OSI	OS	OSUF	OT
<i>GDF9_rs425223128</i>	C	1,000	0,988	1,000	1,000	0,943	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	0,975	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	T	0,000	0,012	0,000	0,000	0,057	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>GDF9_3655</i>	A	0,023	0,000	0,013	0,017	0,000	0,200	0,000	0,393	0,053	0,004	0,033	0,191	0,021	0,122	0,071	0,143
	G	0,977	1,000	0,987	0,983	1,000	0,800	1,000	0,607	0,947	0,996	0,967	0,809	0,979	0,878	0,929	0,857
<i>GDF9_3776G</i>	C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	0,004	0,000	0,132	0,015	0,000	0,000	0,000
	G	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,949	0,996	1,000	0,868	0,985	1,000	1,000	1,000
<i>GDF9_G5_nearFecGEII</i>	A	0,885	1,000	0,962	0,741	0,830	0,800	0,472	1,000	0,608	0,927	0,804	0,938	0,876	0,851	0,696	0,964
	G	0,115	0,000	0,038	0,259	0,170	0,200	0,528	0,000	0,392	0,073	0,196	0,063	0,124	0,149	0,304	0,036
<i>GDF9_G6_nearFecGEI</i>	A	0,115	0,000	0,038	0,240	0,237	0,200	0,528	0,000	0,395	0,075	0,307	0,061	0,111	0,153	0,304	0,036
	G	0,885	1,000	0,962	0,760	0,763	0,800	0,472	1,000	0,605	0,925	0,693	0,939	0,889	0,847	0,696	0,964
<i>GDF9_Embrapa_FecGE</i>	G	0,385	0,756	0,132	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,706	0,067	0,431	0,307	0,297	0,000	0,000
	T	0,615	0,244	0,868	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,294	0,933	0,569	0,693	0,703	1,000	1,000
<i>GDF9_highfertility_FecGH_G8</i>	C	1,000	0,855	0,971	1,000	0,545	1,000	1,000	1,000	1,000	0,853	0,797	0,985	0,961	0,986	1,000	1,000
	T	0,000	0,145	0,029	0,000	0,455	0,000	0,000	0,000	0,000	0,147	0,203	0,015	0,039	0,014	0,000	0,000

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL – Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel.

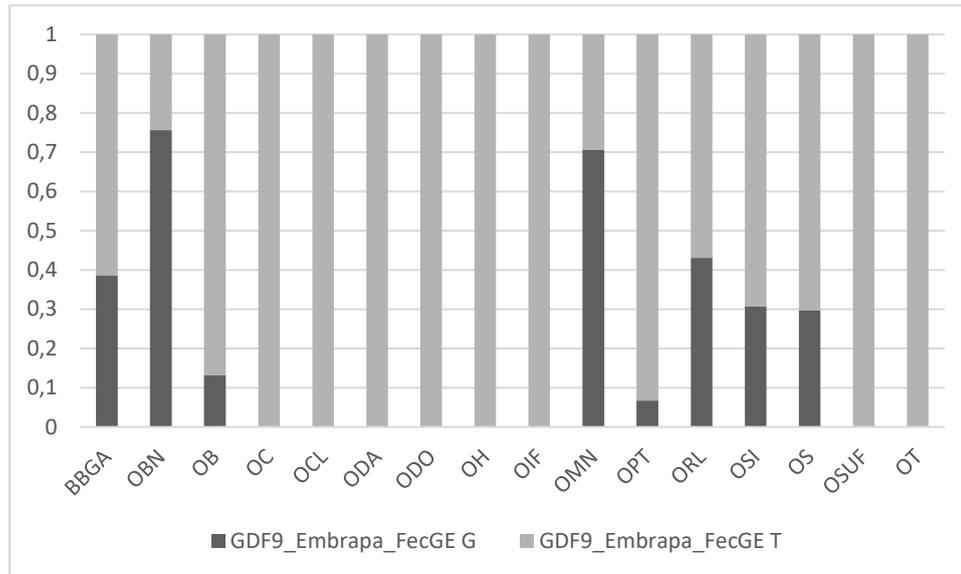


Figura 1. Frequências alélicas do SNP *GDF9_Embrapa_FecGE* no gene *GDF9* (*Growth Differentiation Factor 9*) para todas as raças genotipadas no presente estudo.

Para estimar as frequências haplotípicas no gene *GDF9*, foram analisados 11 SNPs: *GDF9_G1_2039G*, *GDF9_G3*, *GDF9_rs40376560*, *GDF9_G4*, *GDF9_rs425223128*, *GDF9_3655*, *GDF9_3776G*, *GDF9_G5_nearFecGEII*, *GDF9_G6_nearFecGEI*, *GDF9_Embrapa_FecGE*, *GDF9_highfertility_FecGH_G8*. A partir desses SNPs, foram estimados 27 haplótipos diferentes nas raças de ovinos estudadas. Os haplótipos mais frequentes foram o H6 “GGTGCGGAGTC”, presente em todas as 16 populações do estudo, seguido do H4 “GATGCGGGATC”, presente em 14 das 16 populações do estudo e o H3 “GATGCGGAGTC”, presente em 11 das 16 populações analisadas, todos associados a menor prolificidade nas raças brasileiras. Alguns haplótipos raros encontrados foram o H8 “GGGGTGGAGGT”, presente somente na raça Barriga Negra, H10 “GAGGCGGGAGC”, presente somente na raça Bergamácia Brasileira, e H21 “GGGGCGGAAGC”, presente na raça Pantaneira (Tabela 5).

Tabela 5. Frequências haplotípicas estimadas para 11 SNPs localizados no gene *GDF9* (*Growth Differentiation Factor 9*) associado com aumento da prolificidade em ovinos.

População/Raças ¹	H1 ²	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
BBGA	0,011	0,023	0,069	0,103	0,356	0,368								
OBN			0,023		0,072	0,072	0,072	0,012	0,032					
OB		0,013	0,026	0,028	0,054	0,574			0,013	0,010				
OC	0,034		0,017	0,190		0,379								
OCL			0,150	0,045		0,180			0,067		0,020	0,014	0,045	0,014
ODA		0,200	0,050	0,200		0,550								
ODO			0,222	0,500		0,167								
OH		0,357	0,036			0,536								
OIF	0,064			0,282		0,321								
OMN				0,043	0,481	0,103	0,061		0,032					
OPT	0,011		0,011	0,152		0,217	0,016		0,049					0,016
ORL		0,029		0,029	0,309	0,176								
OSI			0,042	0,072	0,247	0,375								
OS		0,071	0,089	0,250		0,375								
OSUF		0,107		0,036		0,357								
OT		0,108		0,108	0,270	0,365								

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL- Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel. ²Haplótipos: H1 - AATACGGAGTC; H2-GATGCAGAGTC; H3-GATGCGGAGTC; H4-GATGCGGGATC; H5-GGGGCGGAGGC; H6-GGTGCGGAGTC; H7-GGGGCGGAGGT; H8-GGGGTGGAGGT; H9-GGTGCGGAGTT; H10-GAGGCGGGAGC; H11-GATGCGGAGTT; H12-GATGCGGGATT; H13 - GGTGCGGAATT; H14 - GGTGTGGAGTT;

Tabela 5 Cont. Frequências haplotípicas estimadas para 11 SNPs localizados no gene GDF9 (*Growth Differentiation Factor 9*) associado com aumento da prolificidade em ovinos.

População/Raças ¹	H15 ²	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	Dados faltantes
BBGA														0,069
OBN														0,716
OB														0,282
OC														0,379
OCL														0,463
ODA														
ODO														0,111
OH														0,071
OIF	0,026	0,013	0,038											0,256
OMN														0,280
OPT				0,011	0,011	0,022	0,011	0,076						0,397
ORL			0,132											0,324
OSI			0,011						0,011					0,243
OS										0,036	0,036			0,143
OSUF												0,071	0,071	0,357
OT														0,149

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL – Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel. ²Haplótipos: H15 - AATGCGGGATC; H16-AGTGC GGAGTC; H17-GATGCACAGTC; H18-AATACGGAGTT; H19-GATGCAGAATC; H20-GATGCGGAATC; H21-GGGGCGGAAGC; H22-GGTGCGGAATC; H23-GGGGCGGAGTC; H24-AATACGGAATC; H25-AATGCGGGGTC; H26-AATGCGGAGTC; H27-AGTACGGAGTC.

3.3 SNPs relacionados a cor de pelagem em ovinos

Para o gene *ASIP*, o único SNP onde as frequências alélicas foram estimadas foi a deleção de cinco pares de base; *ASIP_D5_100-105*. Nesse SNP, a presença dos nucleotídeos, ou seja, a inserção AGGAA foi mais frequente na maioria das populações, com exceção da raça Corriedale, onde a maior frequência (0,615) encontrada foi a deleção (Tabela 6).

No gene *MC1R* retivemos dois SNPs, para o marcador *MC1R_M73K* a maior parte das raças apresentou maior frequência do alelo T, com exceção das raças Crioula Lanada, Santa Inês e Somalis Brasileira, onde o alelo A foi o mais frequente, com 0,511, 0,719 e 0,986, respectivamente. O loco *MC1R_D121N* apresentou alta frequência para o alelo G em grande parte das raças. As raças com maior frequência para o alelo alternativo A foram: Crioula Lanada (0,511), Dorper (0,944) e Somalis Brasileira (0,986), como descrito na tabela 6.

Para o gene *TYRP1*, no loco *TYR_C462T* as frequências alélicas foram maiores para o alelo T nas raças Barriga Negra, Bergamácia Brasileira, Dâmara, Morada Nova, Rabo Largo, Santa Inês e BBGA. As demais raças apresentaram o alelo C como mais frequente sendo que as populações Texel e Dorper foram as que tiveram maiores frequências para esse alelo, 0,962 e 0,833, respectivamente (Tabela 6).

O loco *CoatC_rs429090866* as raças com maior frequência para o alelo G foram: Corriedale (0,948), seguida de Hampshire e Texel com 0,750 cada. A raça com menor frequência para esse alelo foi a Morada Nova, com 0,203.

O loco *MITF_rs414386339* apresentou o alelo C como mais frequente na maioria das raças. O alelo alternativo T foi o mais frequente nas raças Corriedale (0,603), Crioula Lanada (0,512), Hampshire (0,857), Ile de France (0,645), Suffolk (0,607) e Texel (0,714).

No loco *Raly_rs401457425* a raça Hampshire apresentou maior frequência para o alelo G (0,929), seguida de Ile de France (0,897) e Dorper (0,861). Por outro lado, a raça Damara apresentou maior frequência para o alelo A (0,900) (Tabela 6).

Tabela 6. Frequências alélicas dos SNPs genotipados em genes associados na literatura com a cor de pelagem em ovinos.

Loco	Alelo	População/Raças ¹															
		BBGA	OBN	OB	OC	OCL	ODA	ODO	OH	OIF	OMN	OPT	ORL	OSI	OS	OSUF	OT
<i>ASIP_D5_100-105</i>	AGGAA	0,944	0,986	0,977	0,385	0,611	1,000	0,958	1,000	0,882	0,869	0,886	1,000	0,799	0,980	0,825	1,000
	-----	0,056	0,014	0,023	0,615	0,389	0,000	0,042	0,000	0,118	0,131	0,114	0,000	0,201	0,020	0,175	0,000
<i>MC1R_M73K</i>	A	0,356	0,061	0,000	0,000	0,511	0,700	1,000	0,000	0,171	0,270	0,000	0,148	0,719	0,986	0,000	0,000
	T	0,644	0,939	1,000	1,000	0,489	0,300	0,000	1,000	0,829	0,730	1,000	0,852	0,281	0,014	1,000	1,000
<i>MC1R_D121N</i>	A	0,182	0,000	0,000	0,036	0,511	0,000	0,944	0,000	0,077	0,000	0,000	0,000	0,209	0,986	0,000	0,000
	G	0,818	1,000	1,000	0,964	0,489	1,000	0,056	1,000	0,923	1,000	1,000	1,000	0,791	0,014	1,000	1,000
<i>TYR_C462T</i>	C	0,489	0,256	0,338	0,792	0,750	0,417	0,833	0,571	0,694	0,286	0,670	0,196	0,248	0,703	0,704	0,962
	T	0,511	0,744	0,662	0,208	0,250	0,583	0,167	0,429	0,306	0,714	0,330	0,804	0,752	0,297	0,296	0,038
<i>TYR_rs429648229</i>	C	0,839	0,786	0,872	0,621	0,670	0,500	0,611	0,429	0,895	0,996	0,739	0,926	0,918	0,405	0,643	0,929
	T	0,161	0,214	0,128	0,379	0,330	0,500	0,389	0,571	0,105	0,004	0,261	0,074	0,082	0,595	0,357	0,071
<i>CoatC_rs429090866</i>	A	0,534	0,500	0,269	0,052	0,477	0,300	0,278	0,250	0,397	0,797	0,337	0,632	0,288	0,500	0,339	0,250
	G	0,466	0,500	0,731	0,948	0,523	0,700	0,722	0,750	0,603	0,203	0,663	0,368	0,712	0,500	0,661	0,750
<i>Raly_rs401457425</i>	A	0,432	0,523	0,385	0,259	0,443	0,900	0,139	0,071	0,103	0,402	0,413	0,676	0,411	0,689	0,268	0,286
	G	0,568	0,477	0,615	0,741	0,557	0,100	0,861	0,929	0,897	0,598	0,587	0,324	0,589	0,311	0,732	0,714
<i>MITF_rs414386339</i>	C	0,690	0,884	0,718	0,397	0,488	0,100	0,100	0,143	0,355	0,864	0,576	0,735	0,798	0,100	0,393	0,286
	T	0,310	0,116	0,282	0,603	0,512	0,000	0,000	0,857	0,645	0,136	0,424	0,265	0,202	0,000	0,607	0,714

¹Raça/Populações: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC – Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL- Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel.

As estimativas de frequências haplotípicas para o gene MC1R foi calculada utilizando os dois marcadores *MC1R_M73K* e *MC1R_D121N*, localizados no exon 1 do gene, revelaram a existência de 3 haplótipos diferentes H1 TG , H2 AG e H3 AA. O haplótipo H1 denominado ‘*wild type*’, ou selvagem, determina a coloração branca. Em contraste, o haplótipo H3, determinado por dois alelos denominados na literatura E^D/E^D ocasiona o fenótipo de coloração escura. O haplótipo H1 foi o mais frequente, ocorrendo em 15 das 16 raças do estudo. A raça Dorper é a única que não possui o H1, nessa raça o haplótipo mais frequente observado foi o H3, com 0,944. Na raça Somalis Brasileira a frequência do H1 foi baixa, (0,014), sendo o H3 também o haplótipo mais frequente, com 0,986. O haplótipo H3, mutante, está presente em 6 das raças analisadas. O haplótipo H2 está presente em 7 das 16 raças analisadas, e sua maior frequência foi observada na raça Dâmara (0,700) (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências haplotípicas observadas utilizando dois SNPs (*MC1R_M73K* e *MC1R_D121N*) no gene MC1R em raças de ovinos.

População/Raças ¹	H1 ²	H2	H3	Dados faltantes
BBGA	0,636	0,170	0,182	0,011
OBN	0,895	0,058		0,047
OB	0,897			0,103
OC	0,862			0,140
OCL	0,489		0,511	
ODA	0,300	0,700		
ODO			0,944	0,056
OH	0,929			0,071
OIF	0,744	0,077	0,077	0,103
OMN	0,713	0,264		0,023
OPT	0,957			0,043
ORL	0,676	0,118		0,206
OSI	0,268	0,494	0,195	0,040
OS	0,014		0,986	
OSUF	0,964			0,036
OT	1,000			

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC –Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL- Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel.

No gene TYRP1, também dois SNPs (*TYR_C462T* e *TYR_rs429648229*) foram utilizados para estimar as frequências haplotípicas. Esses SNPs se encontram nos exons 1 e 2,

respectivamente. Foram estimados 4 haplótipos distintos, denominados H4 CC, H5 CT, H6 TC e H7 TT, de acordo com a literatura para esse gene. Os haplótipos H4 e H6 estão presentes em todas as raças e no BBGA. O haplótipo H5 não foi observado na raça Bergamácia Brasileira e o haplótipo H7 não está presente nas raças Morada Nova e Texel. Nas raças Crioula Lanada, Dorper e Hampshire não houve falhas. O haplótipo H4 foi o mais frequente na raça Texel (0,857). A maior frequência do haplótipo H5 foi encontrada na raça Somalis Brasileira (0,375). O haplótipo H6 foi o mais comum na raça Morada Nova (0,686). O haplótipo H7 foi o mais comum na raça Dâmara (0,220). Na raça Hampshire o haplótipo H7 também teve frequência de 0,222, porém nessa população, o haplótipo mais frequente foi o H5 com 0,349. As frequências haplotípicas de cada raça e do BBGA podem ser observadas na tabela (Tabela 8).

Tabela 8. Frequências de haplótipos para ovinos de raças brasileiras localmente adaptadas geradas por 2 SNPs (*TYR_C462T* e *TYR_rs429648229*) do gene *TYRP1*.

População/Raças ¹	H4 ²	H5	H6	H7	Dados faltantes
BBGA	0,337	0,146	0,492	0,013	0,011
OBN	0,201	0,032	0,543	0,155	0,070
OB	0,295		0,462	0,115	0,128
OC	0,430	0,225	0,139	0,034	0,172
OCL	0,498	0,252	0,172	0,078	
ODA	0,070	0,180	0,130	0,220	0,400
ODO	0,549	0,284	0,062	0,105	
OH	0,222	0,349	0,206	0,222	
OIF	0,535	0,080	0,260	0,022	0,103
OMN	0,271	0,004	0,686		0,039
OPT	0,498	0,143	0,208	0,107	0,043
ORL	0,122	0,010	0,525	0,019	0,324
OSI	0,203	0,029	0,658	0,051	0,060
OS	0,233	0,375	0,145	0,112	0,135
OSUF	0,346	0,333	0,262	0,024	0,036
OT	0,857	0,036	0,036		0,071

¹População/Raças: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; OBN – Barriga Negra; OB – Bergamácia Brasileira; OC –Corriedale; OCL – Crioula Lanada; ODA – Dâmara; ODO – Dorper; OH – Hampshire; OIF – Ile de France; OMN – Morada Nova; OPT – Pantaneira; ORL- Rabo Largo; OSI – Santa Inês; OS – Somalis Brasileira; OSUF – Suffolk; OT – Texel. ²Haplótipos: H4 – CC; H5– CT; H6 – TC; H7 - TT.

3.4 Análise de fluxo gênico entre diferentes populações da raça Santa Inês

O SNP *ASIP_D5_100-105* o alelo que apresenta a inserção de 5 pb AGGAA foi mais frequente em quase todas as populações, porém EBDA-BA apresentou frequência distribuída de 0,50 para a inserção e 0,50 para o alelo da deleção (χ^2 , $p < 0,05$). Observando o loco *MC1R_M73K* o alelo A foi o mais frequente na maioria das populações, todavia, como no SNP anterior, a população CPAMN apresentou frequências distribuídas entre os alelos A e T (0,500 e 0,500), respectivamente (χ^2 , $p < 0,05$). Vale ressaltar aqui a diferença entre o número de animais entre a EBDA-BA (N=2) e CPAMN (N=15). O SNP *Raly_rs401457425* apresenta o alelo A como o mais frequente na população EBDA-BA (0,750) e frequência distribuída de 0,500 entre A e G na população GAASA-GO (χ^2 , $p < 0,05$). Nas demais populações de SI, o alelo mais frequente foi o alelo "G", como mostra a tabela 9.

Tabela 9. Frequências alélicas nos SNPs que apresentaram divergência entre as distintas populações da raça Santa Inês

Loco	Alelo	Populações ¹						
		BBG A	CNP C	CPAT C	CPAM N	EBDA -BA	GAAS A - GO	UNB- DF
<i>ASIP_D5_100-105</i>	AGGAA	0,750	0,696	0,816	1,000	0,500	1,000	0,583
	-----	0,250	0,304	0,184	0,000	0,500	0,000	0,417
<i>MC1R_D121N</i>	A	0,200	0,199	0,203	0,067	0,000	0,364	0,296
	G	0,800	0,801	0,797	0,933	1,000	0,636	0,704
<i>MC1R_M73K</i>	A	0,700	0,691	0,857	0,500	0,750	0,727	0,708
	T	0,300	0,309	0,143	0,500	0,250	0,273	0,292
<i>TYR_C462T</i>	C	0,233	0,268	0,226	0,267	0,000	0,182	0,260
	T	0,767	0,732	0,774	0,733	1,000	0,818	0,740
<i>TYR_rs429648229</i>	C	1,000	0,876	0,983	0,933	1,000	0,955	0,907
	T	0,000	0,124	0,017	0,067	0,000	0,045	0,093
<i>CoatC_rs4290908</i> 66	A	0,367	0,203	0,356	0,567	0,500	0,455	0,259
	G	0,633	0,797	0,644	0,433	0,500	0,545	0,741
<i>Raly_rs401457425</i>	A	0,433	0,366	0,491	0,367	0,750	0,500	0,389
	G	0,567	0,634	0,509	0,633	0,250	0,500	0,611
<i>MITF_rs41438633</i> 9	C	0,750	0,820	0,824	0,462	1,000	0,591	0,886
	T	0,250	0,180	0,176	0,538	0,000	0,409	0,114

¹Populações: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; CNPC – Embrapa Caprinos e Ovinos; CPATC – Embrapa Tabuleiros Costeiros; CPAMN – Embrapa Meio Norte; EBDA-BA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola; GAASA-GO – Goiás Alimentos; UNB-DF – Universidade de Brasília.

Os loci associados com a característica prolificidade em ovinos, que apresentaram diferença significativa entre as populações da raça Santa Inês são apresentados a seguir. O SNP *BMP15_B1_1118B*, localizado no exon 1, posição 28-30 do gene BMP15, o

alelo que representa a deleção ocorreu com maior frequência na maioria das populações, exceto no CNPC e na UnB-DF onde o alelo que representa a inserção CTT foi mais frequente com 0,805 e 0,556, respectivamente (χ^2 , $p < 0,05$). No gene GDF9, o loco *GDF9_rs425223128* não foi descrito aqui, pois todas as populações foram monomórficas para o alelo C. Precisamente no SNP *GDF9_rs40376560*, o alelo T foi o mais frequente na maioria das populações, com exceção das populações BBGA e CPATC, onde o alelo alternativo G apresenta maior frequência com 0,600 e 0,750, respectivamente (χ^2 , $p < 0,05$). No loco *GDF9_G4* o alelo G está fixado na maioria das populações, com exceção da UnB-DF, que apresenta baixa frequência para o alelo alternativo A (0,077). De maneira similar, no SNP *GDF9_G1_2039G*, a população UnB-DF foi a única em que o alelo G não está fixado, sendo que nessa população, o alelo A ocorre em baixa frequência (0,074). No loco *GDF9_Embrapa_FecGE*, o alelo G foi mais frequente excepcionalmente nas populações BBGA (0,600) e EBDA-BA (0,750). Nas demais populações, o alelo T foi o mais frequente, demonstrando diferença significativa nas frequências alélicas neste loco (χ^2 , $p < 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências alélicas em diferentes populações da raça Santa Inês para os SNPs relacionados a característica de Prolificidade.

Locus	Alelo	Populações ¹						
		BBGA	CNPC	EBDA-BA	CPAMN	CPATC	GAASA-GO	UNB-DF
<i>BMP15_B1_1118B</i>	CTT	0.318	0.805	0.198	0.367	0.000	0.318	0.556
	---	0.682	0.195	0.802	0.633	1.000	0.682	0.444
<i>BMPR1B_SNP_38377_g192a</i>	C	0.967	0.942	1.000	1.000	0.922	0.909	0.963
	T	0.033	0.058	0.000	0.000	0.078	0.091	0.037
<i>GDF9_G1_2039G</i>	A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074
	G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.926
<i>GDF9_G3</i>	A	0.133	0.182	0.000	0.133	0.245	0.045	0.200
	G	0.867	0.818	1.000	0.867	0.755	0.955	0.800
<i>GDF9_rs40376560</i>	G	0.600	0.378	0.750	0.107	0.446	0.300	0.231
	T	0.400	0.622	0.250	0.893	0.554	0.700	0.769
<i>GDF9_G4</i>	A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.077
	G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.923
<i>GDF9_3655</i>	A	0.000	0.004	0.000	0.033	0.017	0.000	0.111
	G	1.000	0.996	1.000	0.967	0.983	1.000	0.889
<i>GDF9_3776G</i>	C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.093
	G	1.000	1.000	1.000	1.000	0.983	1.000	0.907
<i>GDF9_G5_nearFecGEII</i>	A	0.967	0.852	1.000	0.885	0.842	1.000	0.981
	G	0.033	0.148	0.000	0.115	0.158	0.000	0.019
<i>GDF9_G6_nearFecGEI</i>	A	0.033	0.147	0.000	0.125	0.096	0.000	0.019
	G	0.967	0.853	1.000	0.875	0.904	1.000	0.981
<i>GDF9_Embrapa_FecGE</i>	G	0.600	0.353	0.750	0.100	0.287	0.300	0.231
	T	0.400	0.647	0.250	0.900	0.713	0.700	0.769
<i>GDF9_highfertility_FecGH_G8</i>	C	1.000	0.982	1.000	0.967	0.880	1.000	1.000
	T	0.000	0.018	0.000	0.033	0.120	0.000	0.000

¹Populações: BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal; CNPC – Embrapa Caprinos e Ovinos; CPATC – Embrapa Tabuleiros Costeiros; CPAMN – Embrapa Meio Norte; EBDA-BA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola; GAASA-GO – Goiás Alimentos; UNB-DF – Universidade de Brasília.

3.5 Validação da metodologia Fluidigm

Os loci *MITF_rs414386339*, *BMPR1B_SNP_38377_G192A* e *BMP15_Inverdale_FecXI* foram genotipados em 16 animais referência nas plataformas Fluidigm e Illumina® OvineSNP 600K BeadChip. A reprodutibilidade dos genótipos entre as metodologias foi de 100% (Tabela 11), com todos os alelos idênticos em todos os animais genotipados para os 3 marcadores em comum, utilizando o *confidence threshold* estabelecido por nós

Tabela 11. Genótipos obtidos pela tecnologia Fluidigm e Illumina OvineSNP 600K BeadChip, usando 3 SNPs e 16 animais referência de duas raças brasileira de ovinos.

<i>MITF_rs414386339</i>				<i>BMP1B_SNP_38377_G192A</i>		<i>BMP15_Inverdale_FecXI</i>	
Amostra	Raça	Fluidigm		Fluidigm		Fluidigm	
		Illumina Ovine 600K		Illumina Ovine 600K		Illumina Ovine 600K	
CA1515	Santa Inês	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
OMN6916	Morada Nova	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
OMN8387	Morada Nova	C_T	C_T	C_C	C_C	T_T	T_T
OMN8389	Morada Nova	C_T	C_T	C_C	C_C	T_T	T_T
OSI1120	Santa Inês	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
OSI1145	Santa Inês	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_RBM04	Morada Nova	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JWR02	Morada Nova	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JWR01	Morada Nova	C_T	C_T	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JPFO103	Morada Nova	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JLM05	Morada Nova	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JLM33	Morada Nova	C_T	C_T	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JLM31	Morada Nova	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JDGF_78	Morada Nova	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T
SMN_JCG0257	Morada Nova	C_T	C_T	C_C	C_C	T_T	T_T
OSI171	Santa Inês	C_C	C_C	C_C	C_C	T_T	T_T

4. DISCUSSÃO

Os SNPs eliminados funcionaram em menos que 75% da amostragem total e foram desconsiderados de todas as análises seguintes. O SNP, *Y_oY1*, único no cromossomo Y, foi eliminado por não apresentar resultados interpretáveis, pois este apresentou genótipos heterozigotos quando todos os genótipos deveriam ser homozigotos, uma vez que o marcador está localizado na porção não pareada do cromossomo Y.

No total foram genotipados 51 marcadores, sendo que 14 deles falharam, gerando um percentual de 27% de falhas. Com isso, 73% dos marcadores passaram no controle de qualidade, porém dos marcadores que funcionaram, 15 foram monomórficos. Isso já era esperado para as raças deste estudo, especialmente no caso dos marcadores presentes nos genes *BMP15* e *BMPR1B*, que apresentaram apenas um marcador polimórfico cada. Com isso, em estudos futuros, marcadores nestes dois genes podem ser excluídos, uma vez que não contribuem com informações para as raças importantes na ovinocultura brasileira. O mesmo pode ser dito sobre o marcador que foi monomórfico no gene *ASIP*, relacionado a cor de pelagem em ovinos.

Após a aplicação dos filtros de qualidade nas amostras (N=1152), 307 (35%) foram eliminadas por apresentar *call rate* <0,80. É importante relatar que o alto *confidence threshold* definido para cada genótipo, >0,90, foi estabelecido devido às amostras referências, em especial aos genótipos heterozigotos, pois em *confidence threshold* menor (>0,75 – recomendado pelo fabricante) os genótipos heterozigotos divergem entre as amostras de referência genotipadas com o Fluidigm e os Beadchips Illumina OvineSNP50 e OvineSNP600K. Com esse limite estabelecido de *confidence threshold*, muitas amostras foram eliminadas e muitos marcadores foram eliminados por apresentar alto número de dados faltantes. Dessa forma, não podemos dizer que o desenho do SNP e o ensaio em si não funcionou, mas a confiabilidade desses genótipos com menor *confidence threshold* (>0,75) não é alta. No caso do marcador no cromossomo Y, pode ter ocorrido algum desvio na

confeção da sonda, pois mesmo genótipos com alto *confidence threshold* apresentaram resultados não esperados em amostras de sêmen do BBGA.

No momento do desenho dos oligos usando a ferramenta on-line recomendada pela Fluidigm (<https://d3.fluidigm.com/>), nenhum oligo com qualidade baixa foi enviado para confecção do kit, ou seja, somente os SNPs que receberam sondas com qualidade alta (*high*) foram confeccionados, o que novamente não explica o baixo *call rate* associado a esses loci. Vale ressaltar que a causa de genotipagem errônea pode estar associada à qualidade do DNA. Não foram testados diferentes protocolos de extração de DNA de origem de sangue e sêmen. Sendo ajustado somente a quantidade inicial (90 ng) em testes de diluição. Todas as amostras de DNA obtiveram qualidade suficiente observada através da razão 260/280 nm e 260/230 nm no NanoDrop, porém entende-se que muitas vezes o aparelho pode indicar um viés nas medidas.

Em ovinos, o gene *FecB* foi o primeiro identificado como associado à característica de prolificidade em ovinos, com a variante Booroola (*FecB^B*), reportada primariamente na raça Merino Booroola (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001; Wilson et al., 2001). Ainda de acordo com os autores previamente mencionados, a mutação ocorre na base 746 da região de codificação (746 A>G) no domínio de sinalização da quinase intracelular do gene *BMPR1B* causando uma mudança de aminoácido (249 Q>R), sendo associada ao fenótipo hiperprolífico de ovelhas da raça Merino Booroola. Posteriormente, outros estudos observaram novas mutações no gene *BMPR1B*, em outras posições nas raças Small Tail Han, Hu, Texel e Merino Chinesa (Chu et al., 2011). Ainda, outros autores reportaram mutações no gene *BMPR1B* nas raças Cele Black, Sunite, Prairie Tibetan, Suffolk e Tan (Niu et al., 2021).

No presente estudo, todas as raças genotipadas foram monomórficas AA no marcador *BMPR1B_Booroola_FecBB*. De acordo com Davis et al. (1982), animais homocigotos não portadores (++) codificam o aminoácido glutamina (Q), e os portadores da mutação codificam arginina (R), possuindo genótipo homocigoto (FF) ou heterocigoto (F+). Como dito anteriormente, a presença do alelo "G" não foi detectada em nenhuma raça, portanto todos os animais são (++) , ou seja, homocigotos não portadores. Esse resultado está de acordo com estudos prévios realizados em raças brasileiras, como Santa Inês e Morada Nova, onde a mutação Booroola (*FecB^B*) não foi detectada (Holanda et al., 2017).

Os genes *BMP15* e *GDF9* possuem papel crucial no desenvolvimento folicular das ovelhas, além de serem essenciais na determinação da taxa de ovulação e na prevenção da morte celular dos folículos ovarianos (Shimasaki et al., 2004; Hanrahan et al., 2004; Orisaka

et al., 2006; Hussein et al., 2005). O fenótipo de esterilidade foi previamente associado a diferentes variantes nos genes BMP15 e GDF9 (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Bodin et al., 2007; Martinez-Royo et al., 2008; Nicol et al., 2009; Souza et al., 2014). Essas mutações resultam na inativação das proteínas de ambos os genes, levando a não formação dos folículos secundários e consequentemente, a infertilidade em animais homocigotos para os alelos mutantes. No caso dos animais heterocigotos, ocorre um aumento na taxa de ovulação, tornando-os prolíficos (Otsuka et al., 2011).

O gene BMP15 foi primariamente associado ao aumento da taxa ovulatória em ovelhas das raças Hanna (*FecX^H*) e Inverdale (*FecX^I*) (Galloway et al., 2000). Posteriormente, essas mutações foram reportadas na Nova Zelândia, em ovinos da raça Romney (Davis, 2005). Outros autores observaram novas mutações no gene BMP15, ocorrendo em ovinos das raças Cambridge (*FecX^G*) e Belclare (*FecX^B*), além de mutações no gene GDF9 (*FecG^H*) nas mesmas raças (Hanrahan et al., 2004). Em contrapartida, Lassoued et al. (2017) não encontraram as mutações *FecX^B*, e *FecX^G* nas raças Barki, Ossimi e Rahmani. De maneira similar, todas as raças genotipadas no presente estudo apresentaram-se homocigotas GG no marcador *BMP15_Belclare_FecXB_B4*, o que indica a ausência da mutação *FecX^B* em seus genomas. O SNP denominado *BMP15_Inverdale_FecXI*, sendo monomórfico em todas as raças também demonstrou a ausência da mutação *FecX^I*. Esse resultado corrobora com os resultados de Holanda et al. (2017) e Lacerda et al. (2016) para as raças Santa Inês e Morada Nova.

Outras mutações no gene BMP15 já foram previamente descritas na literatura em raças Europeias. A mutação *FecX^L* foi analisada na França na raça Lacaune (Bodin et al., 2007). A mutação *FecX^R* em ovinos Aragonesa da Espanha (Martinez-Royo et al., 2008). E as mutações *FecX^O* e *FecX^{Gr}* nas raças Okulska da Polônia e Givette da França, respectivamente (Demars et al., 2013). Além disso, mutações no gene BMP15 também foram reportadas na Tunísia em ovelhas da raça Barbarine (*FecX^{Bar}*), em ovelhas chinesas da raça Cele Black Sheep e em ovelhas da raça Paquistanesa Cholistani (Lassoued, 2017; Niu et al., 2021; Khan et al., 2022). No presente estudo, nenhuma das mutações supracitadas foi detectada nas raças genotipadas, sendo que o SNP *BMP15_FecXBar101* foi eliminado por *call rate*, ou seja não temos dados para esse loco. De modo similar aos resultados encontrados aqui, polimorfismos no gene BMP15 também não foram detectados nas raças Baraki e Rahmani (El-Seedy et al., 2017; Polley et al., 2010).

No gene GDF9, Silva et al. (2011), reportou pela primeira vez que ovelhas da raça brasileira Santa Inês homocigotas para o alelo *FecG^E* possuíam uma maior taxa

ovulatória. Posteriormente, a mutação também foi reportada na raça Morada Nova (Lacerda et al., 2016). Essa mutação ocasionada pela mudança de nucleotídeo de um T para um G, resulta na substituição de uma fenilalanina (F) por uma cisteína (C) em uma posição conservada do peptídeo maduro. Ainda de acordo com Silva et al. (2011), animais homozigotos para a mutação GG (E/E) apresentam o fenótipo hiperprolífico, com aumento considerável na taxa de ovulação (82%) e prolificidade (58%) quando comparados aos animais homozigotos para o genótipo TT (+/+).

No presente estudo, além de estar presente na raça Santa Inês (0,307), a mutação *FecG^E* foi detectada no BBGA (0,385) e nas raças Bergamácia Brasileira (0,132), Pantaneira (0,067), Rabo Largo (0,431) e Somalis Brasileira (0,297), sendo que as raças que apresentaram maior frequência foram a Morada Nova (0,706) e a Barriga Negra (0,756). Esse resultado reforça o que foi previamente reportado por Lacerda et al. (2016), que detectaram uma alta frequência do alelo *FecG^E* em ovinos Morada Nova. É interessante mencionar que a alta frequência desse alelo reportada aqui pela primeira vez na raça Barriga Negra pode ser uma informação valiosa em estudos futuros de melhoramento genético com essa raça.

A mutação *FecG^E* foi também associada com a característica de partos múltiplos, o que é resultado do processo de aumento da taxa de ovulação, e quanto mais se realiza estudos de genotipagem com as raças brasileiras de ovinos, fica claro que a mutação só está presente em raças deslanadas. Este estudo corrobora com essa afirmação, pois nota-se que há frequência 0 do alelo G nas raças lanadas aqui genotipadas, inclusive na raça Crioula Lanada. A única exceção foi a raça Bergamácia Brasileira, que apresentou 0,132 de frequência para o alelo de interesse (G), no entanto, isso pode ser explicado pelos cruzamentos dessa raça com a raça Santa Inês, ocasionado fluxo gênico entre essas duas raças.

Ainda, considerando a importância que o *FecG^E* exerce sobre a prolificidade das raças brasileiras, os haplótipos que podem ser associados a uma maior prolificidade, foram encontrados apenas nas raças brasileiras, como já era esperado. Esse resultado amplia a relevância da mutação *FecG^E* nos rebanhos nacionais, uma vez que indica a presença desta em outras raças localmente adaptadas de grande importância para a ovinocultura no país. Essa mutação foi genotipada no Banco de Germoplasma Americano (dados não mostrados) em 15 raças de ovinos, e novamente, como o banco é composto de raças lanadas o alelo mutante G não foi encontrado.

Outras mutações no gene GDF9 foram reportadas anteriormente pela literatura. Hanrahan et al. (2004) observou que a substituição de serina (S) por fenilalanina (F) na

posição 395 está associada ao aumento na taxa ovulatória em ovelhas Cambridge e Belclare, denominando a mutação de *FecG^H*. No presente estudo, a mutação supracitada está presente em todas as raças analisadas, inclusive no BBGA. Ainda no gene *GDF9*, Nicol et al. (2009) observou uma mutação responsável pela esterilidade em ovelhas homozigotas e fertilidade em ovelhas heterozigotas da raça islandesa Thoka. No presente estudo, essa mutação não foi avaliada pois o SNP *GDF9_Iceland_FecII_Thoka* apresentou baixo *call rate*.

No Brasil, a mutação Vacaria (*FecG^V*) foi reportada em ovinos da raça Ile de France (Souza et al., 2014). No mesmo estudo, os autores indicaram que a transição de nucleotídeos C para T na posição 943 no quadro de leitura (c.943C>T) é a responsável pelo aumento da taxa ovulatória em ovinos heterozigotos e infertilidade em animais homozigotos. No presente estudo, todos os animais genotipados foram homozigotos para o alelo C, incluindo a raça Ile de France. O mesmo resultado foi obtido para a mutação *FecG⁷*.

Alguns fatores podem explicar as diferenças encontradas nas frequências alélicas dentro de populações de uma mesma raça. Diferenças na estrutura genéticas das raças, ocasionadas principalmente pela distância geográfica e pelos cruzamentos entre os animais podem contribuir para isso, resultando em variação na diversidade genética dentro de um determinado rebanho ou entre rebanhos da mesma raça. Como referência, Maciel et al. (2021) menciona a raça Merino Booroola, que é considerada altamente prolífica e modelo para estudos de prolificidade em ovinos.

A cor de pelagem é uma importante característica econômica em programas de seleção genética com ovinos, sendo determinada por interações de múltiplos genes (Bennet & Lamoreux, 2003). De modo geral, os loci *Agouti* e *Extension* atuam num processo de interação gênica, sendo que a presença do alelo selvagem no *Extension* (E) é necessária para expressão do alelo *Agouti* (A) (Robbins et al., 1993). Alelos dominantes no *Extension* determinam a produção de eumelanina e resultam no fenótipo de coloração preta, enquanto alelos recessivos determinam a pigmentação vermelha/amarela, pálida devido a síntese da feomelanina. No caso dos alelos dominantes no *Agouti*, causam a produção de feomelanina, enquanto alelos recessivos determinam a acumulação de eumelanina e o fenótipo preto/escuro na cor de pelagem (Searle, 1968).

No gene *MC1R*, o ganho de função determina a coloração preta/escuro dominante ou parcialmente dominante, enquanto a perda de função determina o fenótipo vermelho/amarelo/pálido recessivo ou parcialmente recessivo. Estudos anteriores observaram essas alterações em várias espécies de mamíferos, como camundongos (Robbins et al., 1993; Bennett & Lamoreux, 2003), coelhos (Fontanesi et al., 2006), suínos (Kijas et al., 2001),

bovinos (Klungland et al., 1995; Rouzaud et al., 2000) e caprinos (Fontanesi et al., 2009).

Em ovinos, estudos anteriores identificaram duas mutações *missense* no gene MC1R (p.M73K) e (p.D121N). Nessas mutações, o alelo dominante (E^D) é responsável pelo fenótipo de coloração preta, presente nas raças Norwegian Dala (Våge et al., 1999), Damara, Black Corriedale (Våge et al., 2003), Karakul, Black Merino e Black Castellana (Royo et al., 2008). O alelo recessivo (E^+), é o alelo selvagem e está amplamente distribuído na maioria das raças ovinas (Searle, 1968; Sponenberg, 1997).

No presente estudo, as mutações p.M73K e p.D121N no gene MC1R foram genotipadas em todas as raças. Foram definidos três haplótipos (H1, H2 e H3). O haplótipo H1 (definido por duas mutações que causam o E^+) está fixado na raça Texel, e próximo à fixação nas raças Suffolk, Pantaneira e Hampshire. Resultados similares foram reportados nas raças Bergamasca, Appenninica, Delle Langhe, Large-tailed Han, Small-tailed Han, Gansu Alpine Merino, Merino Chinesa, todas de coloração clara (Fontanesi et al., 2010; Yang et al., 2013). As raças com maior frequência para o haplótipo H3 (definido por duas mutações que causam o E^D), foram a Somalis Brasileira (0,986), Dorper (0,944) e Crioula Lanada (0,511). Este haplótipo é associado a coloração escura e já foi reportado previamente em diferentes ovinos de coloração escura, incluindo as raças Crioula Lanada, Massese, Mongolian, Mixian Black Fur (Hepp et al., 2012; Cavalcanti et al., 2017; Fontanesi et al., 2010; Yang et al., 2013). O haplótipo H2 ($E^D E^+$), foi o mais frequente na raça Dâmara (0,700), enquanto na raça Corriedale, apenas o haplótipo H1 foi observado. Este haplótipo ocorreu em baixa frequência no BBGA (0,170) e nas raças Barriga Negra (0,058), Ile de France (0,077), Morada Nova (0,264) e Rabo Largo (0,118). É interessante apontar que a presença do alelo mutante (E^D) já foi reportada previamente nas raças Dâmara e Corriedale (Våge et al., 2003).

No gene ASIP, as mutações principais associadas ao fenótipo preto recessivo em ovinos são as deleções nomeadas D^5 (100-105 del AGGAA), deleção de 5 pb, localizada no exon 2, e D^9 (10-19 del AGCCGCCTC), deleção de 9 pb, também localizada no exon 2, além de uma mutação *missense* (5172T>A ou C126S), localizada no exon 4 (Norris & Whan, 2008; Royo et al., 2008; Gratten et al., 2010). Ainda no gene ASIP, uma duplicação (CNV - *Copy Number Variation*) de 190kb, observada por Norris & Whan (2008), foi associada ao fenótipo branco dominante (A^{Wt}).

Neste estudo, os SNPs *ASIP_G5051C*, *ASIP_T5172A* foram excluídos com baixo *call rate* (<0,75) e a deleção D^9 (*ASIP_D9_10-19*) apresentou genótipo monomórfico para o alelo da inserção "AGCCGCCT" em todas as raças. Na deleção D^5 denominada aqui de *ASIP_D5_100-105*, o alelo da inserção "AGGAA" foi mais frequente na maioria das

raças, estando fixada em Dâmara, Hampshire, Rabo Largo e Texel. Excepcionalmente, na raça Corriedale, o alelo da deleção foi a mais frequente com 0,615. (Tabela 6). Previamente, as deleções D^5 e D^9 foram observadas na raça Crioula Lanada (Cavalcanti et al., 2017). Ainda na raça Crioula Lanada, os autores supracitados indicaram que as deleções D^5 e D^9 não são significativamente associados a cor de pelagem dessa raça. A variante D^9N foi associada ao fenótipo de lã cinza em ovelhas Massese (Fontanesi et al., 2010). É importante ressaltar ainda que, embora não tenha sido possível estimar as frequências alélicas das mutações ASIP D^5 (100-105 del AGGAA), 5172T>A e C126S nas raças genotipadas no presente estudo, interações epistáticas entre os genes MC1R e ASIP já foram reportadas em diversas raças ovinas (Fontanesi et al., 2011; Hepp et al., 2016; Cavalcanti et al., 2017).

Outro gene importante na variação de cor de pelagem em ovinos é o *Tyrosinase-Related Protein 1* (TYRP1), identificado como o responsável pela variação em cor de pelagem em uma população de ovinos da raça Soay (Gratten et al., 2007). Nesse gene foram identificadas algumas mutações interessantes, sendo elas (G869T – Gratten et al., 2007), (G192C) e (C462T) (Deng et al., 2008) e *rs429648229* (J. McEwan – dados não publicados).

Adicionalmente, outras regiões no genoma ovino foram associadas a característica de cor de pelagem, como a mutação *rs401457425* Raly (ASIP) e a mutação *rs429090866* (CoatC), presente no gene *Microphthalmia Transcription Factor* (MITF) (Li et al., 2014).

No presente estudo, dois SNPs do gene TYRP1 foram eliminados com baixo *call rate* < 0,75 (*TYR_G192C* e *TYR_G869T*), restando os SNPs *TYR_C462T* e *TYR_rs429648229* (c.344C>T). A mutação c.462C>T já foi observada em estudos anteriores, incluindo em ovelhas brasileiras da raça Crioula Lanada (Cavalcanti et al., 2017). No entanto, de acordo com Deng et al. (2008), essa é uma mutação silenciosa, que não possui efeito nas sequências de aminoácidos do gene da tirosinase. A mutação c.344C>T, genotipada aqui pelo SNP *TYR_rs429648229*, resulta em troca de aminoácidos, alanina (A) por valina (V). Essa mutação ainda foi pouco explorada na literatura, sendo necessário mais estudos para compreender seu papel na interação com outros importantes genes ligados a cor de pelagem. Dessa forma, para esses polimorfismos, apenas as frequências alélicas e haplotípicas foram estimadas aqui, mas não podemos associá-las com uma característica ou fenótipo específico nos animais, uma vez que mais estudos são necessários para entender o papel destas na cor de pelagem em ovinos. Essa é a primeira vez que são estimadas as frequências haplotípicas para os SNPs supracitados em raças brasileiras. Isso indica que o resultado obtido aqui pode ser

útil em estudos futuros com cor de pelagem em ovinos de diferentes raças, inclusive das raças brasileiras.

Em um estudo GWAS realizado por Li et al. (2014), novas regiões no genoma ovino foram associadas a característica de cor de pelagem. No estudo que investigou ovelhas da raça Finnsheep, os SNPs mais significativos ocorreram no cromossomo 19, destacando-se a mutação *s00651.1* (denominada aqui de *CoatC_rs429090866*), próximo ao gene *Microphthalmia Transcription Factor* (MITF) e a mutação *s66432.1* (denominada aqui de *Raly_rs401457425*) no gene ASIP. Após inspecionar os genótipos do SNP *s66432.1*, que foi o mais significativo no gene ASIP, Li et al. (2014) concluíram que o alelo A possui efeito dominante sobre o alelo G, e que 96% das ovelhas Finnsheep brancas eram homozigotas AA, enquanto apenas 2% das não brancas, não eram homozigotas para esse alelo. No presente estudo, nenhuma população apresentou o genótipo AA (SNP *Raly_rs401457425*), sendo que a raça Dorper foi a que apresentou maior frequência para esse alelo (0,900). Esse resultado indica uma possível discrepância entre as raças analisadas aqui e os ovinos Finnsheep investigados por Li et al. (2014), podendo não ser útil para explicar a cor de pelagem em ovinos brasileiros. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender o papel dessa mutação nas diferentes raças utilizadas no país. O mesmo pode ser dito sobre o SNP *CoatC_rs429090866*, pois uma vez que não foi genotipado em outros trabalhos, ainda não está claro qual relação essa mutação possui com a cor de pelagem em ovinos. É importante ressaltar que excepcionalmente na raça Corriedale, o alelo G desse SNP ocorreu em alta frequência (0,948), estando próximo a fixação nessa raça.

Como mencionado anteriormente, as diferenças nas frequências alélicas encontradas em diferentes populações de uma mesma raça podem ser explicadas por alguns fatores específicos. A distância geográfica pode afetar o fluxo gênico e o nível de miscigenação dentro de determinada população. Previamente, outros autores já haviam observado diferenças de frequências alélicas entre populações distintas da raça Santa Inês e os resultados obtidos aqui reforçam a existência de diferenças entre populações dessa raça (Paiva et al., 2005; McManus et al., 2020; Paim et al., 2021). No caso da população UnB-DF por exemplo, esta parece em algum momento no curso do manejo do seu rebanho, raça Bergamácia Brasileira foi introduzida em cruzamentos, o que corrobora a teoria proposta anteriormente de que os ovinos Santa Inês das regiões Sudeste e Centro-Oeste são mais próximos dessa raça do que ovinos do Nordeste brasileiro (Paim et al., 2021; McManus et al., 2020).

Com relação a semelhança entre as populações de Santa Inês do BBGA, CNPC

e CPATC, a principal explicação é o fato de o banco genético ser composto principalmente de amostras provenientes dos rebanhos CNPC e CPATC. Além disso, os rebanhos supracitados são próximos geograficamente, o que colabora para uma troca de germoplasma entre eles. Resultado similar a este pode ser esperado para a raça Morada Nova, cujos animais se concentram majoritariamente na região Nordeste do país (McManus et al., 2019), próximo aos núcleos de conservação do CNPC. Deve-se considerar ainda que o número amostral da população EBDA-BA foi pequeno, o que pode ter causado interferência nos resultados dessa população específica.

De modo geral, selecionar animais com haplótipos favoráveis é imprescindível para aumentar a produtividade ovinocultura do país. Além disso, usando estudos como esse, é possível entender e garantir a variabilidade genética do germoplasma armazenado em bancos de germoplasma como o BBGA. Com isso, resultados como os encontrados aqui podem ser úteis na conservação das raças a curto e longo prazo, além de auxiliar como um importante recurso no melhoramento ovino. No Brasil, ainda são necessários estudos genéticos de cor de pelagem, especialmente relacionados as raças localmente adaptadas, uma vez que são escassos. Estudos como este podem ser o pontapé inicial para ampliar o entendimento da genética da cor de pelagem nos animais de raças brasileiras.

Neste painel foram genotipados 13 SNPs relacionados a cor de pelagem em ovinos. Destes, 4 falharam (*ASIP_G5051C*, *ASIP_T5172A*, *TYR_G192C* e *TYR_G869T*) e 1 foi monomórfico (*ASIP_D9_10-19*). Portanto, em futuros painéis desse tipo, o SNP monomórfico pode ser eliminado, uma vez que não funciona nas raças aqui estudadas. Dados como esse podem ser extremamente úteis em estudos futuros, uma vez que otimizam a confecção de ferramentas importantes em estudos de melhoramento genético animal, garantindo o custo-benefício e a eficiência de técnicas como a genotipagem por PCR alelo-específica.

A comparação dos resultados obtidos nos ensaios Fluidigm com o Illumina OvineSNP 600K, indicou uma repetibilidade de 100% das amostras genotipadas, com o *confidence threshold* > 0,90. O que ficou evidente que quando aplicado um *confidence threshold* alto, acima do recomendado pelo fabricante, conseguimos repetibilidade e confiabilidade dos genótipos, porém a um custo elevado. Pois a perda de marcadores e amostras ainda pode ser considerada alta para a pesquisa brasileira que conta com recursos escassos. O uso do Fluidigm ainda não está muito difundido na literatura (citar alguns trabalhos) o que torna a padronização dos experimentos ainda um fator mais lento e limitante.

Na validação de parte deste painel reduzido de SNPs, foi possível obter

resultados sólidos, que podem contribuir de forma rápida e efetiva para a ovinocultura brasileira. A vantagem dessa ferramenta é que os marcadores podem ser substituídos por outros que considerarmos mais adequados após essa primeira etapa o que torna a ferramenta financeiramente viável, eficaz e rápida. Finalmente, acreditamos que com os devidos ajustes essa ferramenta está entre uma das mais adequadas atualmente para estimar as frequências alélicas e haplotípicas presentes em marcadores de interesse nas variadas raças ovinas brasileira.

5. CONCLUSÕES

No total, de 51 SNPs genotipados, 14 falharam, sendo assim o rendimento do painel foi de 73%. Além disso, 15 marcadores foram monomórficos, o que indica uma oportunidade de otimizar o painel em futuros estudos, excluindo marcadores que não funcionaram ou que não apresentaram polimorfismo nas raças ovinas de importância no Brasil. É importante ressaltar que embora o painel não tenha alcançado um rendimento de 100%, devido ao alto *confidence threshold* estabelecido ($>0,90$), a confiabilidade dos marcadores que funcionaram é alta, garantido assim, a precisão dos resultados.

De modo geral, os resultados obtidos no presente estudo ampliam a relevância da mutação *FecG^E*, no gene GDF9, nos rebanhos nacionais, reafirmando a importância dessa mutação em estudos de prolificidade com as raças ovinas localmente adaptadas. Outras mutações relevantes no gene GDF9 foram detectadas nas raças aqui genotipadas, o que reforça a importância desse gene na prolificidade de ovelhas brasileiras.

Sobre a característica cor de pelagem, foi possível genotipar com sucesso alguns marcadores em regiões de interesse, sendo que todos os marcadores no gene MC1R funcionaram com precisão, o que pode ser útil em programas de melhoramento que visem selecionar os animais com base em variação de cor de pelagem. Ainda são necessários novos estudos para compreender melhor o papel de algumas mutações. Esses resultados permitiram o aprimoramento do painel reduzido e a validação de parte desse painel mostrando a eficácia na genotipagem de marcadores alvo em múltiplas raças ovinas presentes no Brasil, sendo uma alternativa rápida, econômica e satisfatória em estudos de melhoramento animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLI, R., et al. A review on prolificacy genes in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51 p. 631-637, 2016.
- AMINI, H. R. et al. The novel T755C mutation in BMP15 is associated with the litter size of Iranian Afshari, Ghezel, and Shal breeds. **Archives Animal Breeding**, v. 61, n. 1, p. 153-160, 2018.
- BARAKAT, I. A. H.; et al. Genetic polymorphism of candidate genes for fecundity traits in Egyptian sheep breeds. **Biomedical Research (India)**, v. 28, n. 2, p. 851–857, 2017.
- BENNETT, D.C. & LAMOREUX, M.L. The color loci of mice a genetic century. **Pigment Cell Res.** v. 16, p. 333–344, 2003.
- BODIN, L. et al. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 393–400, 2007.
- BULTMAN, S.J.; MICHAUD, E.J.; WOYCHIK, R.P. Molecular characterization of the mouse *Agouti* locus, **Cell**, v. 71, p. 1195-1204, 1992.
- CASTRO, F.C., CRUZ, M.H.C., LEAL, C.L.V. Role of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 8, p.1065-1074, 2016.
- CAVALCANTI, L.C.G.; et al. Genetic characterization of coat color genes in Brazilian Crioula sheep from a conservation nucleus. **Pesq. agropec. bras.**, v.52, n.8, p. 615-622, 2017.
- CHU, M. X. et al. GDF9 as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 8, p. 5199–204, 2011.
- CHU, M. X. et al. Study on BMP15 and GDF9 as candidate genes for prolificacy of Small Tail Han sheep. **Yi chuan xue bao**, v. 32, n. 1, p. 38-45, 2005.
- CLOP, A. et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nat Genet.**, v. 38, n. 7, p. 813-8., 2006.

- CRAWFORD, J.L. & MCNATTY, K.P. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, p. 339–343, 2012.
- DAVIS, G. H. Major genes affecting ovulation rate in sheep. **Genetics, selection, evolution: GSE**, v. 37 Suppl 1, p. S11–S23, 2005.
- DAVIS, G.H., et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. **Nr.Z. JI agrie. Res.**, v. 25, p. 525-529, 1982.
- DEMARS, J. et al. Genome-Wide Association Studies Identify Two Novel BMP15 Mutations Responsible for an Atypical Hyperprolificacy Phenotype in Sheep. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 4, p. e1003482, 2013.
- DENG, W.D. et al. Pigmentation in black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the Tyrosinase gene. **Mol Biol Rep.**, v. 35, p. 379- 385, 2008.
- EL-MAATY, A.M.; et al. Effect of Diet Restriction and Polymorphism of Bone Morphogenetic Protein-15 and Growth Differentiation Factor-9 (GDF9) on Reproductive Performance of Three Egyptian Fat Tail Sheep Breeds. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 18-24, 2022.
- EL-SEEDY, A. S.; et al. Genetic screening of FecB, FecXG and FecXI mutations and their linkage with litter size in Barki and Rahmani sheep breeds. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 6, p. 1133–1137, 2017.
- 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**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FONTANESI, L, BERETTI F, RIGGIO V, DALL’OLIO S, et al. 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 evidence. **BMC Genet.**, v. 10, p. 47, 2009.
- FONTANESI, L., TAZZOLI, M., BERETTI, F. RUSSO, V. Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Anim. Genet.**, v. 37, p. 489-493. 2006.
- FONTANESI, L.; DALL’OLIO, S.; BERETTI, F.; PORTOLANO, B.; RUSSO, V. Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes. **Animal**, v.5, p. 8-17, 2011.
- FONTANESI, L.; et al. Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene in sheep with different coat colours and identification of the putative e allele at the ovine Extension locus. **Small Ruminant Research**, v. 91, p. 200-207, 2010.
- FRIEDMAN, M. The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. American Statistical Association, v. 32, p. 675-701, 1937.

- GALLOWAY, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature genetics**, v. 25, n. 3, p. 279–283, 2000.
- GRATTEN J, PILKINGTON JG, BROWN EA, BERARDI D, PEMBERTON JM AND SLATE J
The genetic basis of recessive self-colour pattern in a wild sheep population. *Heredity* 104:206-214, 2010.
- GRATTEN, J. et al. Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. **Proc Biol Sci.**, v. 274, p. 619–26, 2007.
- HANRAHAN, J. P. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biol. Reprod.**, v. 40, n. 4, p. 900-9, 2004.
- HEPP, D.; GONÇALVES, G.L.; MOREIRA, G.R.P.; FREITAS, T.R.O. de. Epistatic interaction of the melanocortin 1 receptor and agouti signaling protein genes modulates wool color in the Brazilian creole sheep. **Journal of Heredity**, v.107, p. 544-552, 2016.
- HEPP, D.; GONÇALVES, G.L.; MOREIRA, G.R.P.; FREITAS, T.R.O.; MARTINS, C.T.D.C.; WEIMER, T.A.; PASSOS, D.T. Identification of the e allele at the Extension locus (MC1R) in Brazilian Creole sheep and its role in wool color variation. *Genetics and Molecular Research*, v.11, p. 2997-3006, 2012.
- HOLANDA, G.M.L. et al. Survey of mutations in prolificacy genes in Santa Inês and Morada Nova sheep. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 69, n. 4, p. 1047-1053, 2017.
- HUSSEIN, T.S., et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 5257–68, 2005.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal (PPM)**. Rio de Janeiro: IBGE, 2021.
- INTERNATIONAL SHEEP GENOME CONSORTIUM (ISGC). Disponível em: <
<http://www.sheepmap.org/>> Acesso em: 24/03/2023.
- KHAN, J.M., et al. Mutations in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion in Cholistani infertile sheep. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 8, 2022.
- KIJAS JM, MOLLER M, PLASTOW G AND ANDERSSON L. A frameshift mutation in MC1R and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. **Genetics**, v. 158, p. 779- 785. 2001.
- KLUNGLAND, H.; et al. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. **Mamm. Genome**, v. 6, p. 636-639, 1995.

- LACERDA, T. S. A.; CAETANO, A.R.; FACÓ, O.; FARIA, D.A.; McMANUS, C. M.; LÔBO, R. N.; SILVA, K. M.; PAIVA, S. R. Single marker assisted selection in Brazilian Morada Nova hair sheep community-based breeding program. **Small Ruminant Research**, v. 139, p. 15–19, 2016.
- LASSOUED, N., et al. FecX^{Bar} a Novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 43, 2017.
- LI, M.H., et al. 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**, v. 112, p. 122-131, 2014.
- MACIEL, M.S. et al. Avanços no tema genes da prolificidade ou fertilidade em ovinos: revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. 12, 2021.
- MARINA, H. et al. Low-density SNP panel for efficient imputation and genomic selection of milk production and technological traits in dairy sheep. **J Dairy Sci.**, v. 105, n. 10, p. 8199-8217, 2022.
- MARTINEZ-ROYO, A. et al. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. **Animal Genetics**, v. 39, n. 3, p. 294–297, 2008.
- MCMANUS, C.; FACÓ, O.; SHIOTSUKI, L.; et al. Pedigree analysis of Brazilian Morada Nova hair sheep. **Small Rumin. Res.**, v. 170, p. 37–42, 2019.
- MCMANUS, C.; HERMUCHE, P.; PAIVA, S.R.; et al. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 3, p. 15, 2013.
- MCMANUS, C.; PAIVA, S.R.; CAETANO, A.R.; et al. Landscape genetics of sheep in Brazil using SNP markers. **Small Rumin. Res.**, v. 192, n. 4, 106239, 2020.
- MEADOWS, J.R.S. et al. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. **Anim. Genet.**, v. 35, n. 5, p. 379-85, 2004.
- MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5104–5109, 2001.
- MULSANT, P., et al. Prolificacy genes in sheep: the French genetic programmes. **Reprod Suppl.**, v. 61, p. 353-359, 2003.
- NICOL, L. et al. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. **Reproduction**, v. 138, n. 6, p. 921–933, 2009.
- NIU, Z. G., et al. The Identification of Mutation in *BMP15* Gene Associated with Litter Size in Xinjiang Cele Black Sheep" **Animals**, v. 11, p. 668-670, 2021.

- NORRIS, B.J. & WHAN, V.A. A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. **Genome Res.**, v. 18, p. 1282-1293, 2008.
- ORISAKA, M., et al. Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-independent follicular growth in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 737-744, 2006.
- OTSUKA, F.; MCTAVISH, K. J.; SHIMASAKI, S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 1, p. 9–21, 2011.
- PAIM, T.P.; PAIVA, S.R.; DE TOLEDO, N.M.; et al. Origin and population structure of Brazilian hair sheep breeds. **Anim Genet.**, v. 52, p. 492–504, 2021.
- PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; SALOMÃO, A. N.; et al. (Ed.). **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019, p. 109-129.
- PAIVA, S.R.; SILVÉRIO, V.C.; FARIA, D.A. et al. Origin of the main locally adapted sheep breeds of Brazil: a RFLP-PCR molecular analysis. **Archivos de Zootecnia**, v.54, p.395-399, 2005.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.
- POLLEY, S.; et al. Polymorphism of BMP1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 5, p. 985–993, 2010.
- RAOUL, J. et al. Using a very low-density SNP panel for genomic selection in a breeding program for sheep. **Genet Sel Evol.**, v. 49, n. 76, 2017.
- ROBBINS, L.S. et al. Pigmentation phenotypes of variant Extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function, **Cell**, v. 72, p. 827–834, 1993.
- ROUZAUD, F.; et al. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (MC1R). **Genetics Selection Evolution**, v.32, p.511-520, 2000.
- ROYO, L.J.; et al. 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. **Anim Genet**, v. 39, p. 290-298, 2008.
- SEARLE, A.G. Comparative Genetics of Coat Colour in mammals, **Logos Press**, London, UK, 1968.
- SHIMASAKI, S., et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004.
- SILVA, B. D. M. et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9)

- gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 89–92, 2011.
- SOUZA, C. J. H. et al. Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. **Animal genetics**, v. 45, n. 5, p. 732–9, 2014.
- SOUZA, C.J., et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPR-1B) gene. **Journal of Endocrinology**, v. 2, p. 1-6, 2001.
- SOUZA, C.J.H. et al. Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. **Animal Genetics**, v. 45, n. 5, p. 732-9, 2014.
- SPONENBERG, D.P. Genetics of colour and hair texture. **In: The genetics of sheep Piper LR and Ruvinsky A**, New York., p. 51–86.1997.
- VAGE, D.I.; et al. Mapping and characterization of the dominant black colour locus in sheep. **Pigment Cell Research**, v. 16, p. 693–7, 2003.
- VAGE, D.I.; et al. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 39.43, 1999.
- WILSON, T. et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 4, p. 1225–1235, 2001.
- YANG, G.L. et al. Mutations in the MC1R gene determine black coat color phenotype in Chinese sheep. **The Scientific World Journal.**, v. 2013, p. 8, 2013.

ANEXOS

Anexo A: Sequências ASP1, ASP2, LSP e STA dos SNPs relacionados a características de produção em ovinos.

SNP	ASP1	ASP2	LSP	STA
ASIP_D5_100-105	CATGGAAGAATTGT TCTTCAGGTTCC	CATGGAAGAATTGT TCTTCAGGTTCA	AGCCACCTGGCACCTGA G	CAGAAGGGAAAT CCAACAGGTTCC
ASIP_D9_10-19	CCTCCTGGGATGGA TGTC A	CCTCCTGGGATGGA TGTC C	ACTGAGGAAGCACAGG CAGA	GCCTTCTCTGTCTG CTCTCAA
ASIP_G5051C	GATGAAGAACGTG GCACGG GTTGAGCACGCGG	GATGAAGAACGTG GCACGC GGTTGAGCACGCGG	CAGCTGTCGCGGGTGG	CCACAGAGAAAAG GCTCCG AGGCGCGCTCAG
ASIP_T5172A	CA	GCT	CGTGCGCCTTCTGCCA	CAG
BMP15_B1_118B	AAAGCACCAGTCCC CAAAGA	AGCACCAGTCCCCA AAGG	GATGGTCTCTGAGCA TCCT	GTCATTTGGACCC TATGTTCCATAA
BMP15_FecX Bar101	TGGTGAGGCCGCT GG	CTGGTGAGGCCGCT GT	TCCAGGGTCTGTATGTG CCAG	GCCACCATGGTG AGGC
BMP15_Galway_FecXE_B2	AGGTTTGGTCTTCT GAACACTCTG	GAGGTTTGGTCTTC TGAACACTCTA	GGCATGGCACTTCATCA TTGGA	TCTTTCAGGCCTT TAGGGAGA
BMP15_Grivette_FecXGr	GGATCATTGCTCCC CATCTCTATAC	GGATCATTGCTCCC CATCTCTATAT	AGTACCCGAGGACATAC TCCCT	GCTGGGCTGGGA TCACT
BMP15_Hanna_FecXH	CATGATGGGCCTGA AAGTAACC	GCATGATGGGCCTG AAAGTAACT	CAGCCCAGCTGCTGGAA	GCCCCTCCAGGG AGC
BMP15_Inverdale_FecXI	TTCCTCCACCCTTT TCAAGT	GTTCCCTCCACCCTT TCAAGA	TCCAGTGATCCCAGCCC AG	GCATGATGGGCC TGAAAGT
BMP15_Lacune_FecXL	CCCGAGGACATACT CCCTTAC	ACCCGAGGACATAC TCCCTTAT	ACTGGATCATTGCTCCCC ATCT	TTGAGACCATAGT GTAGTACCCG
BMP15_Olkska_FecXO	CACTATGGTCTCAA TTCTCCCA	CACTATGGTCTCAA TTCTCCCC	CAGCTCACTGACAAGGT TCTGG	GGAGTATGTCTC GGGTACT
BMP15_rs55628000	AAACCTCTCCCTAA AGGCC	CAAACCTCTCCCTA AAGGCCT	CGAGCCCTCCTCAAGAG AAGA	ACTCAGAGTGTTT AGAAGACCA
BMPR1B_A104G	GAGTCTTCTGGACA ATGGTGGT	AGTCTTCTGGACAA TGGTGGC	CCCCACCCCTCGTCCAA	GTGCTGCAAATAT TGTTGACCG
BMPR1B_Boroola_FecBB	TGAATTTGCTTTGCT ATCGTCCTCT	GAATTTGCTTTGCT ATCGTCCTCC	GCCGTGAACGCACTAAC AGT	CCTTTTCCAATCT GTTTCACCATCT
BMPR1B_rs418841713	TGCCTCATCAACAC CGTCC GATGATAGAAGAA	ATGCCTCATCAACA CCGTCT CGATGATAGAAGA	CCAGCTGGTCCGAGAG ACA	ACAGACTTATACT CACCCAAGATGT GATGATAGAAGA
BMPR1B_rs428753381	GATGACTCTGGGAT G	AGATGACTCTGGGA TA	TGAGCCTTCTAGTCCTA GACATCCA	AGATGACTCTGG GA
BMPR1B_SNP_38377_g192a	TCCAGAAGTGACCA CAGGC	CATCCAGAAGTGAC CACAGGT	GCACAGATGGATATTGT TTCACGATGAT	CCTTCTAGTCCTA GACATCCAGA
BMPR1B_T1019C	AGATCTGAAAAGTA AGAACATCCTGGT	GATCTGAAAAGTAA GAACATCCTGGC	GCCCAGGTCAGCTATAC AGCA	ACCAGCAATTGCC CATCG
BMPR1B_T1043C	GGTGAAGAAAAAT GGAACCTGCTGTAT	GGTGAAGAAAAAT GGAACCTGCTGTAC	CAGCCAAGCCCAGGTCA G	GCCCATCGAGATC TGAAAAGT
CoatC_rs429090866	GGATGACGTTGGT GGTACACC	GGATGACGTTGGT GGTACACT	CAGGGCCATGCGTCAGC	CCTTCCCATCAAC CCATAGG
GDF9_3655	AGAGTCATGTTAAA	AGAGTCATGTTAAA	AAGACCAGCTGCAGCAT	AGCAGTGAGGGC

	CAGGCTGTCC	CAGGCTGTCT	CC	GCTAC
	GCATTCCCTCCACC	GGCATTCCCTCCAC	CCTCTCTTCTGGTCAGGA	CTCAGGCTTTTCA
GDF9_3761G	CTAAAAG	CCTAAAAA	CCC	CAGGTGG
	CCTCTCTTCTGGTCA	CCTCTCTTCTGGTCA	GTGGCATTCCCTCCACCC	CCACGGGGTAGG
GDF9_3776G	GGACC	GGACG	TA	CAGAT
GDF9_42688	GCATTCCCTCCACC	GGCATTCCCTCCAC	GCCCTCTCTTCTGGTCAG	CTCAGGCTTTTCA
2553	CTAAAAG	CCTAAAAA	GA	CAGGTGG
GDF9_Embra	CTCACATTCAATTCTG	CTCACATTCAATTCTG	TTCCAGCTTCAGTCAATC	AGCTAAGTCTAAA
pa_FecGE	GGGAAAAAGAA	GGGAAAAAGAC	TGAGT	GTCATGGAGCT
GDF9_G1_20	CCAGATGACAGAG	GCCAGATGACAGA	GTCCCCTCCTTGGTAGC	GGAAACCCCCAG
39G	CTTTGCG	GCTTTGCA	GTA	GCT
	GGGAAAAGAAATG	GGGAAAAGAAATG		TTGCATATACATT
	GAGTTGTTGAAAGT	GAGTTGTTGAAAGT	GTTACTGTTGTGGAACA	TAACAGGAAAGG
GDF9_G3	ATAC	ATAT	TTTATTCAAGTCAGT	G
	ACATGTCTGTAAAT	CACATGTCTGTAAA		GGCCTCCCACAA
GDF9_G4	TTTACATGTGCGG	TTTTACATGTGCGA	CGCGCTGAAGGATGCTG	GAGGAATAT
GDF9_G5_ne	GGAGAGTGCCAGC	GGAGAGTGCCAGC	TTCACTCAGATTGACTG	CGTCAACCGAGA
arFecGEII	TCTGAA	TCTGAG	AAGCTGGAA	GACCAG
GDF9_G6_ne	ACTCAGATTGACTG	ACTCAGATTGACTG	CAGGAGAGTGCCAGCTC	GGAGCTCACATTC
arFecGEI	AAGCTGGAAC	AAGCTGGAAT	TGA	ATTCTGGG
	GTTGTATTTGTGTG	GTTGTATTTGTGTG	AGCTGAAGTGGGACAAC	TCCCCTTTACAGT
GDF9_G7	GGGCCAC	GGGCCAT	TGGAT	ATCGAGGG
	GCTGAAGGATGCT	CGCTGAAGGATGCT	TGGCCTCCCACAAGAGG	AAGAGTCATGTTA
GDF9_Han	GCAGC	GCAGA	AA	AACAGGCTGTC
GDF9_Iceland				
d_FecII_Thok	CCTGCCAAGTATAG	CTGCCAAGTATAGC	CGATTGAGCCATCAGGC	TGCCAAGACCATC
a	CCCTTTGA	CCTTTGC	TCG	CTGTGTA
GDF9_OMN_	CATTCCCTCCACCCT	CATTCCCTCCACCCT	CCTCTCTTCTGGTCAGGA	CTCAGGCTTTTCA
3763G	AAAAGGA	AAAAGGT	CCC	CAGGTGG
GDF9_rs4037	CTCACATTCAATTCTG	CTCACATTCAATTCTG	TTCCAGCTTCAGTCAATC	AGCTAAGTCTAAA
6560	GGGAAAAAGAC	GGGAAAAAGAA	TGAGT	GTCATGGAGCT
GDF9_rs4252	ACCATGGTGTGAAC	ACCATGGTGTGAAC		AGTTTCTCATGGA
23128	CGGAG	CGGAA	ACTGTCCCAGGGCGGTC	TGATGTTCTGC
GDF9_rs4260	CTGAAGTGGGACA	GCTGAAGTGGGAC		GCTCCATGACTTT
65119	ACTGGATTG	AACTGGATTA	CCCTGGGACAGTCCCCT	AGACTTAGCTTT
GDF9_Vacari	CTGAGGGTGTAAAG	CTGAGGGTGTAAAG	AGCTGGCACTCTCCTGG	TGGGAGAAGAAG
a- FecXV	ATCGTCCC	ATCGTCCT	TC	CTGCTGA
MC1R_D121	CAGCAGCTGGACA	ACAGCAGCTGGAC	AGCAGAGGCTGGACACC	GGCGGCCGTGGT
N	ATGTCATTG	AATGTCATTA	AT	ACA
	CAGGCAGCAGATG	CAGGCAGCAGATG		ACCAGCAGGTCG
MC1R_M73K	AAGTAGTACA	AAGTAGTACT	GCCGCCATCGCCAAGA	GACA
		AATGAAACACAATT		AAGCTGAGCATA
MITF_rs4143	TGAAACACAATTTG	TGAGTCCTAAATTC	AAGGGAATACACACATG	CCATAAATGAAAC
86339	AGTCCTAAATTTCC	CT	GAATGAGGA	A
	GGTTTACTGTCATT	GGTTTACTGTCATT	TTTGGTTTGCTTAATATT	GGCTGTATAATGT
MSTN_6723	GTATTCAAATCTCA	GTATTCAAATCTCA	TATAAGTATTTAAAATAAT	GAATGTGAAATTT
GA	ACG	ACA	GGAA	CAA
Raly_rs40145	AAGATCAGGCAGG	AGATCAGGCAGGG	CAGTAGACTCAAGACCT	TGTTTGTATGCCTG
7425	GGTGTTT	GTGTTC	GGCCT	GTGTGTA
	CATCCAGACAAAGA	GCATCCAGACAAAG	ACGGAACAACGCCCTG	CGTGTCCCTTGAC
TYR_C462T	GGTCATAAACG	AGGTCATAAACA	T	ACATAATAATGC

TYR_G192C	CCGCGAGTCTTGGC CG	CCGCGAGTCTTGGC CC	GCCAAAGCACTGGCAGG TT	TCAGTTCCCCTTC ACGGG
TYR_G869T	TCTTTTCTCAATGGC GAGTAGTCTG	TCTTTTCTCAATGGC GAGTAGTCTT	TTGCATAGGGTTCCCAG GGT	ACTCTTATAAGCC CGAACTCTGT
TYR_rs42964 8229	CCGGGAGTCGGCT ATCG	CCGGGAGTCGGCT ATCA	CGCTGCGGTTTCTCATCA GG	CGGCCATCATGTG GGTAGT
Y_oY1	TTCACTGACCTAGA AAGAAAACCTGAA	TCACTGACCTAGAA AGAAAACCTGAG	GAGCATGGGAAGTAAAT GCTAAGCT	GCATGTAGCTCCA GAATATTTCACT
BMP15_Belcl are_FecXB_B 4	CATTTGCCTCAATC AGAAGGATGC	CATTTGCCTCAATC AGAAGGATGA	CTCAGCCTTCCTGTGTCC CT	TTGTACAAGATAC TCCCATTTGCC
GDF9_highfe rtility_FecGH _G8	ACCATGGTGTGAAC CGGAG	ACCATGGTGTGAAC CGGAA	CCAGGGCGGTCCGACA	GAGTCAAGTTTCT CATGGATGATGT