

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

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PADRÕES DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA
CRIOLA**

LILIAN CRISTINA GOMES CAVALCANTI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
Novembro de 2015**

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

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PADRÕES DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA
CRIOULA**

ALUNA: LILIAN CRISTINA GOMES CAVALCANTI

ORIENTADOR: SAMUEL REZENDE PAIVA,PhD

CO-ORIENTADORA: CONCEPTA MCMANUS PIMENTEL,PhD

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 143/2015

**BRASÍLIA/DF
Novembro de 2015**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CAVALCANTI, L.C.G. Avaliação genética de padrões de pelagem em ovinos da raça Crioula. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 64 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 achase 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

CAVALCANTI, L. C. G. Avaliação genética de padrões de pelagem em ovinos da raça Crioula. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais).
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2015.

1. *Ovis aries* . 2. Recursos genéticos animais. 3. coloração da pelagem .4. *MC1R, TYR, ASIP*.I. Paiva, S. R. II. PhD.

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

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PADRÕES DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA
CRIOULA**

LILIAN CRISTINA GOMES CAVALCANTI

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

APROVADO POR:

**SAMUEL REZENDE PAIVA, PhD (Embrapa)
(ORIENTADOR)**

**ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**SILVIENE FABIANA DE OLIVEIRA, PhD (Universidade de Brasília - UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF,
04 de Novembro de 2015.**

DEDICO

Aos meus pais,

*Fada Regina Gomes
Francisco Monteiro Cavalcanti*

AGRADECIMENTOS

Senhor meu Deus, eu te agradeço, por estar no comando da minha vida, agradeço por me ajudar me capacitar e amparar. Sem ti nada sou. Sou imensamente grata a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador e pesquisador, PhD. Samuel Rezende Paiva por seus valiosos ensinamentos, pela indispensável paciência e disponibilidade. Obrigada pela orientação, mas principalmente, pela confiança por sua dedicação e cuidado. Valeu por tudo!

Não poderia deixar de agradecer a pesquisadora PhD. Danielle Paiva, sua ajuda foi fundamental para meu crescimento, levarei seus ensinamentos para todas as áreas da minha vida. Muito obrigada pela paciência, pela atenção, disponibilidade e compreensão e por me ajudar, quando eu mais precisei.

A minha Co-Orientadora PhD. Concepta McManus Pimentel, agradeço por todo o apoio orientação, disponibilidade, e ensinamentos.

Sou grata ao corpo docente do programa de Pós Graduação em Ciências Animais, por desempenharem a árdua tarefa de disseminar conhecimentos de forma tão valorosa.

Meu agradecimento especial ao pesquisador PhD. Arthur da Silva Mariante obrigada, por sua orientação indispensável, pelo apoio e disponibilidade. E principalmente pelas incríveis aulas de conservação de recursos genéticos animais.

Gostaria de agradecer a todos da Universidade de Brasília, em especial a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária por todo suporte. Ao secretário do programa de pós-graduação, Cristiano Araújo de Figueiredo meus sinceros agradecimentos.

Sou grata a Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão do recurso financeiro.

A Embrapa Pecuária Sul, agradeço pela parceria, e por permitir a utilização das amostras dos animais do rebanho de conservação para realização deste trabalho. Em especial agradeço ao pesquisador Dr. José Carlos Ferrugem Moraes, pelo apoio, suporte e disponibilidade.

Agradeço ao grupo de pesquisadores do Cenargen, Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia, Dr^a Silvia Castro pelos conselhos e ensinamentos e momentos de incentivo e orações, obrigada por sua amizade. Dr^a Maria do Socorro Maués, obrigada por toda ajuda aos demais pesquisadores, Dr. Alexandre Floriane, Dr. Paulo Sergio dedico meus profundos agradecimentos.

Ao pesquisador PhD. Alexandre Caetano agradeço por tudo.

A pesquisadora PhD. Patrícia Ianella quero agradecer por tudo, por estar sempre disponível pronta a ajudar. Muito obrigada por contribuir pela minha formação, aprendi muito com você. Ao técnico do laboratório de genética animal Gleison de Biazio deixo toda minha amizade e respeito e agradeço profundamente por tudo que aprendi, agradeço por todo apoio na realização dos experimentos. E pelas boas rizadas.

Naiara Silva, minha amiga, lhe agradeço por todo conhecimento por suas valiosas dicas e amizade!

Aos antigos amigos do LGA, não poderia deixar de agradecer, por todos os momentos de trabalho compartilhados, pela ajuda, pela amizade enfim por apenas estarem presentes. Meu muito obrigada a Wanessa Beluco, Marney, Vanessa, Angela, Matheus Moura, Tatiana Taty.

Aos amigos mais recentes do LGA, quero que saibam que minha caminhada ficou mais bacana com vocês ao meu lado, sempre me incentivando e dividindo momentos maravilhosos e também os momentos ruins, por isso agradeço pela amizade, ajuda e conhecimentos compartilhados. Agradeço as longas conversas e momentos de distração, meu muito obrigada aos amigos: Alcebíades Renato, Arnaldo Basso, Caio Castro, Cecília Carreiro, Caliandra Bona, Daniel Pimentel, Diana Machado, Elisabete Cristina, Elaine Carvalho, Luciana Vilela, Larissa Venâncio, Maria Malane, Matheus de Andrade, Suellen Rezende, Thaisa Lacerda, Ronyeri Olegário e Joelima Santuza.

Agradeço a minha família, por todo incentivo e compreensão, especialmente aos meus filhos Adrian Henrique e Paulo Augusto e minha irmã Márcia Regina por todo amor! Aos meus pais sou grata por tudo.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.2 OBJETIVO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Ovelha Crioula.....	7
2.2 Núcleo de Conservação da Raça Crioula.....	8
2.3 Gênese da Pigmentação: fatores genéticos e bioquímicos.....	9
2.3.1 <i>Locus extensão</i> : Receptor 1 da Melanocortina (<i>MC1R</i>).....	11
2.3.2 <i>Locus agouti</i> : Proteína Sinalizadora Agouti (<i>ASIP</i>).....	13
2.3.3 <i>Locus marrom</i> : Proteína Associada à Tirosinase 1 (<i>TYRP1</i>).....	14
3. Diversidade genética e Conservação Recursos Genéticos Animais (CRGA).....	15
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA COR DE PELAGEM EM	
OVINOS DA RAÇA CRIOLA DO SUL DO BRASIL.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4. CONCLUSÕES.....	47
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

ÍNDICE DE TABELAS

CAÍTULO 1- AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PADRÕES DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA CRIOULA

Tabela 1. Relação de polimorfismos identificados nos genes <i>MC1R</i> , <i>ASIP</i> e <i>TYRP1</i> em diversas raças ovinas.....	4
--	---

CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA CRIOULA DO SUL DO BRASIL

Tabela 1. Resumo dos cruzamentos controlados realizados no Núcleo de conservação dos ovinos da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul.....	29
Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação dos genes <i>ASIP</i> , <i>MC1R</i> e <i>TYRP1</i> e condições de amplificação dos ensaios de PCR.....	32
Tabela 3. Relação dos haplótipos do gene <i>MC1R</i> identificados a partir do sequenciamento de 953pb.....	37
Tabela 4. Distribuição das frequências alélica e genotípica para alelos E^D e E^+ dentro do loco de extensão <i>MC1R</i> para diferentes colorações de pelagens identificadas nos ovinos crioulos do Núcleo de Conservação da Embrapa Pecuária Sul.....	37
Tabela 5. Distribuição das frequências absolutas dos haplótipos identificados para loco de extensão <i>MC1R</i> para diferentes colorações de pelagens identificadas nos ovinos crioulos do Núcleo de Conservação da Embrapa Pecuária Sul.....	38
Tabela 6. Distribuição das frequências alélica e genotípica para SNPs identificados no gene <i>ASIP</i> do Núcleo de Conservação da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul.....	39
Tabela 7. Relação dos haplótipos do gene <i>TYRP1</i> identificados a partir do sequenciamento de 1,609 pb.....	41

Tabela 8. Distribuição das frequências alélica e genotípica dos SNPs identificados no gene <i>TYRP1</i> em ovinos com diferentes colorações de pelagens do Núcleo de Conservação da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul.....	41
Tabela 9. Distribuição das frequências absolutas dos haplótipos identificados para <i>TYRP1</i> em diferentes colorações de pelagens identificadas nos ovinos crioulos do Núcleo de Conservação da Embrapa Pecuária Sul.....	42
Tabela 10. Associação das cores de pelagens observadas nos animais da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul com os polimorfismos nos genes <i>ASIP</i> e <i>MC1R</i>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

CAÍTULO 1- AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PADRÕES DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA CRIOULA

Figura 1. Distribuição de frequências de fenótipos quanto a cor da lã dados coletados durante 5 anos na população de ovinos da raça Crioula criados no CPPSUL.....	3
Figura 2. Representação esquemática simplificada da síntese de eumelanina e feomelanina..	10

CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA CRIOULA DO SUL DO BRASIL

Figura 1. Colorações de pelagens analisadas do Núcleo de Conservação de ovinos Crioulos da Embrapa Pecuária Sul.....	28
Figura 2. Método de avaliação visual da coloração da lã.....	29
Figura 3. Duplicação de ~190kb situada no <i>locus ASIP</i> , que abrange a região de codificação <i>AHCY</i> e promotora <i>ITCH</i>	34
Figura 4. Estrutura simplificada e esquemática do gene <i>ASIP</i>	35
Figura 5. Distribuição dos animais em relação à cor da pelagem no rebanho de ovinos da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul	36
Figura 6. Eletroferogramas da análise de fragmentos para identificar a duplicação do gene <i>ASIP</i> em ovinos da raça Crioula.....	40
Figura 7. Distribuição da presença e ou ausência das deleções existentes no exon 2 do gene <i>ASIP</i> observadas em diferentes cores de lã de ovinos Crioulo da Embrapa Pecuária Sul.....	40

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

A^D : alelo duplicado do gene *ASIP*;
 A^{ND} : alelo não duplicado do gene *ASIP*;
 A^a : alelo recessivo não-agouti *ASIP*;
 A^{wt} : alelo dominante agouti *ASIP*;
ASIP: proteína sinalizadora agouti;
 ARCO: Associação Brasileira de Criadores de Ovinos;
 AMPc: adenosina monofostato cíclico;
 ABCOC: Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos;
 Cenargen : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;
 CPPSUL: Centro de pesquisa Embrapa Pecuária Sul;
D5: deleção de 5pb;
N5: seguimento de 5pb não deletado;
D9: deleção de 9pb;
N9: seguimento de 9pb não deletado;
 DCT: dopacromo tautomerase;
 DNA : ácido desoxirribonucleico;
 dNTPs: desoxirribonucleotídeos;
 E^+ : alelo selvagem do *locus extensão*;
 E^D : alelo dominante do *locus extensão*;
 EDTA : ácido etilenodiamino tetracético
 EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
 h : diversidade haplotípica;
 HiDi : formamida;
 ITCH: itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase;
 L-DOPA: L-3,4-diidroxifenilalanina;
 LGA : Laboratório de Genética Animal
MC1R: receptor de melanocortina 1;
 $MgCl^2$: cloreto de magnésio;
 OCL : ovino Crioulo Lanado;
 pb : pares de base;
 PCR : reação em cadeia da polimerase;
 RGA: recurso genético animal;
 SAP : fosfatase alcalina de camarão;
 SNP : polimorfismo de base única;
 TBE : tris-borato-EDTA;
TYRPI: *locus* da tirosinase relacionada a proteína-1;
 UV: ultravioleta;
 α -MSH:hormônio melanócito estimulante ou melanocortina;
 ηg : nanograma;
 π : diversidade nucleotídica;
 μl : microlitro;
 μM : micromolar;
 ® : marca registrada;

AVALIAÇÃO GENÉTICA DE PADRÕES DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA CRIOULA

Mestranda: Lilian Cristina Gomes Cavalcanti

Orientador: Samuel Rezende Paiva, Ph.D.

RESUMO

Ovinos da raça Crioula são localmente adaptados ao sul do Brasil e produzem lã medulada e naturalmente pigmentada com uma alta variabilidade de cores (preto, marrom, castanho, branco e cinza) e com potencial para uso econômico na região. A compreensão dos componentes genéticos responsáveis pela coloração nessa raça poderá auxiliar a seleção de cores específicas para nichos de mercado e/ou produtores bem como irá auxiliar na composição do Banco de Germoplasma de forma a conservar a maior diversidade genética possível para essa característica. Resultados preliminares obtidos no rebanho de conservação da raça Crioula sugerem que a diversidade fenotípica para cor de pelagem se manifesta de forma bimodal (animais com cores escuras e claras). Um total de 115 animais do Núcleo de Conservação da ovelha Crioula da Embrapa Pecuária Sul (Bagé, RS) foram selecionados para compor este estudo que buscou polimorfismos nos genes *MC1R*, *ASIP* e *TYRP1*. Foram sequenciados um total de 953, 5.353 e 1.609 pb, respectivamente para cada gene onde foram encontrados um total de 14 marcadores de base única (SNPs). Adicionalmente, dois ensaios com primers fluorescentes foram realizados para detectar presença de duplicações e ou deleções no gene *ASIP*. Apenas 7 dos 115 animais testados apresentaram um padrão de pelagem que não pode ser explicado pelos polimorfismos analisados nos três genes estudados. Tais resultados sugerem que a grande variabilidade fenotípica observada na raça Crioula demandará novos estudos de forma a se explicar 100% da diversidade observada. O painel de marcadores usado nesse estudo foi eficiente o suficiente para implementar um programa de seleção assistida no Núcleo de Conservação da raça Crioula desta forma foi possível selecionar os animais que terão seu germoplasma criopreservado.

Palavras-chave: coloração da pelagem *Ovis aries*, recursos genéticos animais, *ASIP*, *MC1R*, *TYRP1*

GENETIC EVALUATION OF FUR PATTERNS IN CRIOULO LANADO SHEEP

Author: Lilian Cristina Gomes Cavalcanti

Advisor: Samuel Rezende Paiva, Ph.D.

ABSTRACT

The Creole sheep is a locally adapted breed from southern Brazil that produces a medulated and naturally pigmented wool with a high variability of colors (black, chestnut, brown, white and gray) and has potential for economic use in the region. Understanding the genetic components responsible for the color in this breed will help in the selection of specific colors for niche markets and / or will assist in the composition of the Germplasm Bank to preserve highest genetic diversity for this characteristic. Preliminary results from the conservation flock of the Creole breed suggest that phenotypic diversity in coat color manifests itself in bimodal form (animals with dark and light colors). A total of 115 sheep from the Conservation Nucleus of Creole Sheep from Embrapa South Livestock (Bagé, RS) were analyzed for polymorphisms in genes *MC1R*, *ASIP* and *TYRP1*. A total of 953; 5,353 and 1,609 bp were analysed respectively for each gene where a total of 14 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found. In addition, two fluorescent assay primers were performed to detect the presence of duplication and / or deletions in the *ASIP* gene. Only 7 of the 115 animals showed a coat pattern that cannot be explained by polymorphisms analyzed in the three genes. These results suggest that the phenotypic variability observed in Criollo requires further studies to explain 100% of the observed diversity. The marker panel used in this study was efficient for the implementation of a marker assisted selection program in Creole Conservation Center to select animals for germplasm cryopreservation.

Keywords: *Ovis aries*, animal genetic resources, coat color, *MC1R*, *TYRP1*, *ASIP*

CAPITULO 1

1.INTRODUÇÃO

Crioula é uma raça ovina localmente adaptada ao Sul do Brasil. Esta raça, possui velos medulados e naturalmente coloridos, tem grande parte do seu uso na confecção de artesanatos e tapeçaria industrial (Moreira & Silva, 2004; Arco, 2013). As cores da lã Crioula variam do branco ao preto, passando pelas cores marrom, castanho e cinza (Gonçalves *et al.*, 2010). Essa raça é mantida tanto por produtores bem como por um núcleo de conservação *in situ* localizado na Embrapa Pecuária Sul, (CPPSUL) em (Bagé RS), onde são realizados diversos estudos voltados à coloração, reprodução e manejo da raça (Moraes & Souza, 2011; Vaz, 2000). A compreensão dos componentes genéticos responsáveis pela coloração nessa raça poderá auxiliar a seleção de cores específicas de lã para nichos de mercado e/ou para produtores bem como irá auxiliar na composição do Banco de Germoplasma de forma que possibilitará a conservação de grande parte da diversidade genética existente para essa característica.

Resultados preliminares de análises fenotípicas da coloração observada em cruzamentos direcionados no rebanho de conservação da raça Crioula sugerem que a diversidade existente se manifesta de forma bimodal quanto à classificação em cores escuras e claras da pelagem (Moraes & Souza., 2011) (Figura 1) Desta forma, o presente trabalho teve como motivação usar o conhecimento obtido nas análises preliminares de coloração do núcleo de conservação *in situ* da raça Crioula para buscar identificar os principais polimorfismos em genes chave reconhecidamente responsáveis pela coloração da pelagem na espécie ovina.

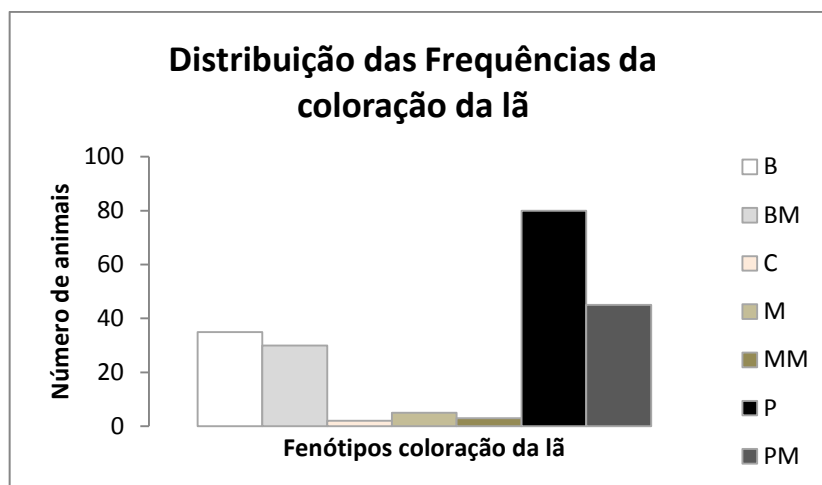


Figura 1 Distribuição de frequência de fenótipos quanto a cor da lã dados coletados durante 5 anos na população de ovinos da raça Crioula criados no CPPSUL. Legenda: branco, branco mascarado, castanho, mouro, mouro malhado, preto e preto malhado. Adaptado (Moraes & Souza., 2011).

A coloração da pelagem dos animais é uma característica fenotípica de natureza poligênica. Porém, três genes principais destacam-se na determinação da cor da pelagem. Estudos pioneiros desenvolvidos inicialmente com ratos, revelaram a relevância dos genes *ASIP*, *MC1R* e *TRY* como principais responsáveis pela regulação e controle da determinação da coloração (Searle, 1968; Bennett & Lamoreux, 2003). Estes genes foram estudados em diversas espécies de animais como bovinos (Klungland *et al.*, 1995), suínos (Kijas *et al.*, 2001), ratos (Bennett & Lamoreux, 2003), coelhos (Fontanesi *et al.*, 2006), caprinos (Fontanesi *et al.*, 2009), bubalinos (Miao *et al.*, 2010), iaques (Chen *et al.*, 2014) e ovinos (Han *et al.*, 2015). A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais polimorfismos identificados até o momento na espécie ovina.

Estudos do gene *MC1R* em ovinos das raças Corriedale, Damara, Merino negro, Castellana negra e Karakul revelaram a existência de dois alelos: o alelo selvagem (E^+) que é recessivo e amplamente distribuído dentre as raças ovinas, e o dominante (E^D), que resulta em pelagem negra e é decorrente das mutações não sinônimas (218T>A M73K e 361G>A D121N) (Vage *et al.*, 1999 e 2003, Royo *et al.*, 2008).

Determinadas mutações no gene *ASIP* foram apontadas como as possíveis causas do fenótipo preto recessivo. São elas deleções de 5 pb (100-105 del AGGAA) e 9pb (10-19 del AGCCGCTC) e uma mutação não sinônima no exon 4 (5172T>A C126S) (Norris

& Whan, 2008; Royo *et al.*, 2008; Gratten *et al.*, 2010). Norris & Whan (2008) identificaram em ovinos uma duplicação de 190kb que engloba o gene *ASIP*, e que foi associada ao fenótipo branco dominante.

Tabela 1. Relação de polimorfismos identificados nos genes *MC1R*, *ASIP* e *TYRP* em diversas raças ovinas.

Raça	Gene	Polimorfismos	Genótipos*		Referência
			Colorido	Branco	
Norwegian Dala	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	E^+E^+	Vage et al. (1999)
Damara Merino negro	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	E^+E^+	Vage et al. (2003)
Corriedale negra	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	E^+E^+	Vage et al. (2003)
Manchega	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	E^+E^+	Calvo et al. (2006)
Xalda	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	-	Royo et al. (2008)
Karakul	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	-	Royo et al. (2008)
Merino negro	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	-	Royo et al. (2008)
Castellana	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_-	-	Royo et al. (2008)
Romney Marsh	<i>MC1R</i>	A12G G144C	-	CC	Deng et al. (2009)
Nanping	<i>MC1R</i>	A12G G144C	GC CC	-	Deng et al. (2009)
Massese, Valle del Belice	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_- E^+E^+	E^+E^+	Fontanesi et al. (2010)
Crioula Lanada	<i>MC1R</i>	T218A G361A	E^D_- E^+E^+	E^+E^+	Hepp et al. (2012)
Manchega, Rosa Aragonesa	<i>MC1R</i>	s26449	s26449	-	Kijas et al. (2013)
Texel	<i>ASIP</i>	D5 D9 T5172A	N9N5T	-	Norris & Whan. (2009)
Texel, Romanov	<i>ASIP</i>	D5 D9 T5172A	N9N5A	-	Norris & Whan. (2009)
Merino Romanov	<i>ASIP</i>	D5 D9 T5172A	D9N5A	-	Norris & Whan. (2009)
Merino branco	<i>ASIP</i>	D5 D9 T5172A	-	N9N5T	Norris & Whan. (2009)
Merino branco	<i>ASIP</i>	D5 D9 T5172A	-	N9D5T	Norris & Whan. (2009)
Merino branco	<i>ASIP</i>	D5 D9 T5172A	-	D9N5T	Norris & Whan. (2009)
Barbary ,Merino	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	A^{ND}	-	Fontanesi et al. (2010)
Merino branco	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	-	A^D	Fontanesi et al. (2010)
Massese negro	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	A^{ND}	-	Fontanesi et al. (2010)
Massese cinza	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	-	A^D	Fontanesi et al. (2010)
Sarda	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	-	A^D	Fontanesi et al. (2010)
Appenninica	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	-	A^D	Fontanesi et al. (2010)
Bergamasca	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	-	A^D	Fontanesi et al. (2010)
Soay	<i>ASIP</i>	D5 T5172A	N5T m	D5A vb	Gratten et al. (2010)
Finnsheep	<i>ASIP</i>	s66432.1	-	s66432.1	Li et al. (2010)
Tibetana	<i>ASIP</i>	$A^D A^{ND}$	A^{ND}	A^D	Han et al. (2010)
Soay	<i>TYRP</i>	G869T	GG GT	TT	Gratten et al. (2007)
Romney Marsh	<i>TYRP</i>	G192C C462T	-	GC CC	Deng et al. (2008)
Nanping	<i>TYRP</i>	G192C C462T	GC GG	-	Deng et al. (2008)

* E^+ alelo selvagem recessivo, E^D alelo preto dominante, A^D alelo duplicado, A^{ND} alelo não duplicado, D9 deleção 9pb, D5 deleção 5 pb, N5 supressão da deleção de 5pb e N9 supressão da deleção de 9pb.

ASIP e *MC1R* agem de forma epistática na espécie ovina de forma que, em geral, é necessária a presença do alelo selvagem do *MC1R* (E^+) para que o produto dos alelos do gene *ASIP* seja observado (Vage *et al.*, 1999; Fontanesi *et al.*, 2011, Hepp *et al.*, 2012). A perda de função no gene *MC1R* causa produção de feomelanina e dá origem as cores claras, já alelos dominantes acarretam em cores escuras. (Barsh *et al.*, 2000; Klungland & Vage, 2000;

Girardot *et al.*, 2005). Ganho de função no gene *MC1R* provoca a ativação constante do receptor e resulta em cores escuras devido à produção contínua de eumelanina.

Poucos estudos investigando a relação destes genes com coloração de pelagem foram realizados em raças brasileiras de ovinos localmente adaptados (Hepp *et al.*, 2012; Muniz, 2015). A grande variabilidade fenotípica para cor de pelagem observada nos ovinos da raça Crioula torna a mesma um ótimo modelo biológico para realizar estudos que permitam identificar os genes e polimorfismos associados a tais padrões de cor de pelagem.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral:

Determinar o efeito dos *loci Extensão* (gene *MC1R*), *Agouti* (gene *ASIP*) e *Marrom* (gene *TYRP1*), na variabilidade fenotípica existente na coloração da lã da raça ovina Crioula.

1.2.2 Objetivo Específico:

Analisar a sequência nucleotídica parcial dos genes *ASIP*, *MC1R* e *TYRP* de animais do Núcleo de Conservação de ovinos da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul de forma a aumentar a compreensão dos mecanismos genético evolutivos que coordenam a coloração da pelagem na raça.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Ovelha Crioula

As raças de ovinos brasileiros descendem de raças ovinas inseridas no Brasil no período da colonização portuguesa e espanhola no século XVIII.(Vaz, 2000). Estudos revelaram que a raça Crioula tem como ancestral direto a raça hispânica Lacha, dentre outras raças envolvidas no seu surgimento estão as raças comerciais exóticas Corriedale, Romney e Churra espanhola. (Henkes *et al.*, 1993). Atualmente Crioula se tornou uma raça com padrões definidos e foi reconhecida como raça localmente adaptada.

A Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Crioulos (ABCOC) foi fundada em 1999 e no ano seguinte houve grande incentivo para produção de lã naturalmente colorida. A homologação do registro da raça pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ocorreu logo em seguida, conforme portaria nº 38 de 10 de janeiro de 2001. Desde então o registro da raça passou a ser realizado pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (Moreira, 2003, Vaz, 2002).

A descrição do padrão racial caracteriza as Crioulas como ovelhas lanadas de médio porte, com bom temperamento, apreciadas por apresentarem ótima habilidade materna e por serem de fácil manejo, possuem aptidão, para produção de lã. Sua pele e carne são muito apreciadas. (Vaz *et al.* 1997; Vaz, 2000). A pele é de qualidade industrial, pois tem resistência e suavidade. A carne é apreciada devido à maciez e sabor diferenciado (Arco, 2013., Moraes *et al.*, 2015). A lã é naturalmente colorida e muito utilizada na tapeçaria industrial (*carpet wool*) artesanato. A lã apresenta velos com fibras meduladas (pelos) e fibras finas (lanilha) o velo é de maior comprimento se comparado à lã de outras raças ovinas (Arco, 2013; Moraes & Souza, 2011). As ovelhas Crioulas de coloração preta produzem uma lã, fina que se assemelha a fios de cabelo (Moraes *et al.*, 2015). Esse tipo de lã tem utilização limitada

na fabricação de alguns tipos de artesanato devido à dificuldade de fiação da fibra, porém é bem aproveitada na confecção de pelegos para montaria, possuindo grande demanda popular no Rio Grande do Sul (Vaz *et al.*, 2002; 2003).

A raça Crioula possui algumas vantagens adaptativas, como a tolerância a endoparasitas. Essa raça ovina é adaptada às condições climáticas e de vegetação da região Sul e produz bem em sistemas de baixa tecnificação, onde presumidamente raças comerciais menos adaptadas não se manteriam (Vaz *et al.*, 2002; 2003; Moraes & Souza, 2011; Moraes *et al.*, 2015). Atualmente as ovelhas Crioulas habitam a região Sul do Brasil e outros países de condições climáticas extremas, como o Uruguai e o Peru (Villela, 2011). Alguns poucos rebanhos também podem ser encontrados em São Paulo e Rio de Janeiro, porém em menor escala (Moraes *et al.*, 2015).

2.2. Núcleo de Conservação da Raça Crioula

No século passado o rebanho de ovinos era numeroso, no entanto, a busca por uma padronização de sistema de produção e máxima produtividade incentivou a inserção de ovinos comerciais exóticos nos rebanhos de ovelhas Crioula. Os cruzamentos indiscriminados com diversas raças de ovinos comerciais causaram um acentuado decréscimo no número efetivo das ovelhas Crioulas (Moreira, 2002). Após um período de eminente ameaça de extinção, a raça Crioula foi resgatada e em 1982, o núcleo de conservação *in situ* situado na Embrapa Pecuária Sul, (CPPSUL) campo experimental de (Bagé RS) foi fundado.

Inicialmente, o núcleo foi formado por poucos animais, cerca de 40 ovinos, e por meio de monta natural e acasalamentos controlados, houve gradual aumento da população conservada (Vaz, 2000). O núcleo de conservação da raça Crioula é fechado a mais de 15 anos e vem realizando ações de modo a manter parte da diversidade fenotípica do rebanho conservado. Com o intuito de preservar e compreender melhor a raça o núcleo desenvolve diversificadas pesquisas acerca de características produtivas reprodutivas e fenotípicas do rebanho de conservação (Vaz, 2000).

Um exemplo de estudo realizado pela CPPSUL foi referente à variabilidade fenotípica da coloração da lã na raça Crioula onde resultados preliminares referente à diversidade relacionada a cor da lã das ovelhas do núcleo de conservação indicou a existência de variabilidade bimodal (Moraes *et al.*, 2015). A variabilidade encontrada no núcleo indica a

existência de dois tipos diferentes de coloração conforme a classificação em eumelanina e feomelanina, cores escuras e claras respectivamente onde atuam os processos bioquímicos e genéticos. A diversidade fenotípica da cor encontrada no núcleo pode ser devido à características herdadas na formação da raça que inclui ancestrais vindos da península ibérica ainda no período da colonização, juntamente com outras raças trazidas para o Brasil, Argentina e Uruguai com o intuito de desenvolver a atividade lanífera.

2.3. Gênese da Pigmentação: fatores genéticos e bioquímicos

O composto orgânico responsável pela coloração dos animais é o polímero melanina. Trata-se de um polímero de composição complexa, derivado do aminoácido tirosina e cuja produção tem relação com eventos iniciais na embriogênese dos vertebrados. O primeiro evento ligado à origem dos pigmentos é o surgimento de células multipotentes denominadas de células da crista neural. Algumas destas células se diferenciam originando os melanoblastos, que são os precursores de melanócitos. Nesta fase, os melanoblastos tem motilidade para migrar no sentido ventral até recobrir totalmente o corpo do animal (Hoekstra *et al.*, 2006A).

Os melanoblastos podem percorrer duas rotas: permanecer na epiderme da pele ou seguir para os folículos pilosos, onde ocorrerá a diferenciação em melanócitos (Otto, 2006). A produção da melanina presente na pele, penas, pêlos e fibras ocorrem nas células especializadas, os melanócitos. Os pigmentos gerados são armazenados nas estruturas intracelulares chamadas melanossomos (Piper *et al.*, 1997; Sturm, & Frudakis., 2004).

Desta forma a gênese da pigmentação dos animais é intrinsicamente dependente da formação quantidade, densidade, velocidade de produção e migração dos melanócitos que sintetizam os dois tipos básicos de melanina: eumelanina que origina cores escuras como preto e marrom e feomelanina referente ao branco e amarelo (Searle, 1968; Takeuchi *et al.*, 1996).

O processo de síntese de melanina é iniciado igualmente para ambos os tipos de melaninas. A enzima limitante tirosinase é responsável pela condução das etapas iniciais de oxidação do aminoácido tirosina até Dopa e seguinte conversão até Dopaquinona (Sturm & Frudakis., 2004). As reações subsequentes da dopaquinona, a oxiredução à leucodopacromo e 5,6 diidroxindol-2-carboxílico culminam na produção de eumelanina. A formação da

feomelanina ocorre através da inserção do aminoácido cisteína que será convertido em Dopaquinona (Ito & Wakamatsu, 2011).

O processo de definição do tipo de melanina a ser produzido dependerá inicialmente da escala de atividade das enzimas envolvidas na melanogênese como a tirosinase (*TYR*) e proteína relacionada à tirosinase 1 (*TYRP1*) e dopacromo tautomerase (*DCT*) (Sturm & Frudakis, 2004). Níveis elevados de atividade da tirosinase desencadeiam a produção de eumelanina, já níveis baixos culminam com a produção de feomelanina (Ito & Wakamatsu 2003).

O complexo processo de síntese da melanina engloba diferentes genes, sendo o mais amplamente estudado, o receptor de melanocortina1 *MC1R* (Figura 2). O gene *MC1R* sintetiza a proteína que é expressa diretamente nos receptores localizados no interior da membrana plasmática dos melanócitos (Sponenberg, 1997). Estes receptores, denominados receptores de membrana, atuam na via de transdução de sinal químico e tem a função de promover a conexão entre os meios intracelular e extracelular (Otto, 2006; Hoekstra *et al.*,2003).

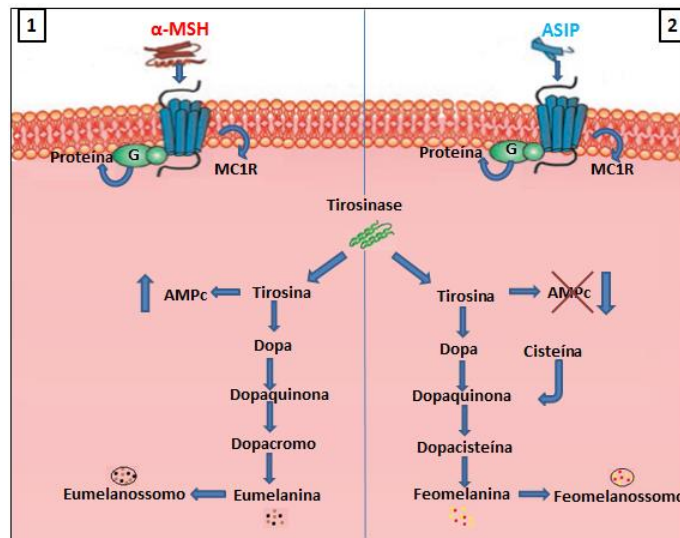


Figura 2. Representação esquemática simplificada da síntese de eumelanina e feomelanina.

Quadro (1): o hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) se liga ao receptor *MC1R*. A proteína G, que está acoplada ao receptor desencadeia transdução de sinal químico que leva à ativação da enzima tirosinase, e conseqüentemente gera ativação do segundo mensageiro intracelular, adenosina monofostato cíclico (AMPc). A tirosinase realiza a oxidação da tirosina. Após reações químicas a Dopa é convertida a dopaquinona. Outras reações são desencadeadas então ocorre a produção do polímero eumelanina. Quadro (2): A presença e atuação do antagonista *ASIP*, evita que o

α -MSH se ligue ao receptor de *MC1R*, conseqüentemente, os níveis de atividade de AMPc diminuem. A enzima tirosinase oxida a tirosina e após outras sequências de oxidação de compostos químicos ocorre a inserção de cisteína, e posterior produção de feomelanina. Figura adaptada (Corso *et al.*, 2013).

A interação existente entre receptores de *MC1R* e a regulação do sistema da coloração pode sofrer influência de eventos de ganho e perda de função. Mutações que alteram os sítios de ligação ou mesmo os domínios responsáveis pela atividade do *MC1R*, podem gerar diferentes efeitos na regulação do tipo de melanina que será sintetizada, podendo interferir na produção e tipo de coloração da pelagem dos animais (Kijas *et al.*, 1998; Klunland & Vage, 2000; Kijas *et al.*, 2001; Kerns *et al.*, 2004).

Mutações descritas em bovinos e roedores revelaram a existência da perda da atuação e da função do gene *MC1R*. Estes experimentos esclareceram que a perda da função normal do gene *MC1R* causa diferentes colorações de pelagem, alterando o fenótipo (Rouzaud *et al.*, 2000; Bennet & Lamoreux, 2003; Otto, 2006). A perda de função ocorre quando não existe comunicação entre o receptor e α -MSH, levando à síntese de feomelanina cores claras. No caso de ganho de função, a ativação constitutiva dos receptores ocorre independente da presença do α -MSH. Assim níveis elevados do composto AMPc, são produzidos e ocorre a produção constante do pigmento escuro eumelanina.

2.3.1. Locus extensão: Receptor 1 da Melanocortina (*MC1R*)

O gene *MC1R*, pertencente à superfamília das melanocortinas, é um dos genes principais que atua na expressão e variação da pigmentação, sendo altamente conservado em diferentes espécies de animais (Klunland *et al.*, 1999). Este gene possui apenas um exon, e a proteína codificada por ele tem sete domínios transmembranares acopladas à proteína-G (Vanetti *et al.*, 1994; García-Borrón *et al.*, 2005; Rouzaud & Hearing, 2005) essa proteína atua diretamente na estimulação da tirosinase e no controle de produção da eumelanina e feomelanina (Klunland *et al.*, 2000, Mundy, 2005; Hoekstra *et al.*, 2006B).

Em ovinos o *locus extensão* é o responsável pela produção do fenótipo preto dominante na espécie ovina. Ao analisar ovinos brancos e pretos da raça Norwegian Dala, Vage (1999), identificou duas mutações que apresentaram segregação completa com a cor preta, desta, forma o alelo preto dominante foi relatado na raça Norwegian Dala.

A ativação constitutiva do gene *MC1R* foi atribuída à uma substituição de um único nucleotídeo nos domínios transmembrana do gene. Esse tipo de mutação foi descrito primeiramente em camundongos (E92K e L98P) (Lu *et al.*, 1998), sendo posteriormente observada em ovinos. As mutações de troca de uma única base foram encontradas no códon 73, substituindo o aminoácido metionina por lisina (M73K), e no códon 121, substituindo aspartato por asparagina (D121N). Segundo os resultados de Vage (1999) os animais brancos foram homozigotos para o alelo selvagem (E^+), enquanto os negros, que apresentaram as duas mutações, foram classificados como preto dominante (E^D).

A confirmação de que a ocorrência das duas mutações seriam necessárias para produzir um animal preto dominante surgiu com o trabalho de Vage *et al.* (2003). Utilizando técnicas moleculares de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase e Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição), os autores analisaram as raças ovinas (Damara, Merino Preto e Corriedale Preto) e conseguiram rastrear as mutações (M73K e D121N). Outros estudos também encontraram as mesmas mutações do preto dominante (Fontanesi *et al.*, 2010; Fontanesi *et al.*, 2011 Kijas *et al.*, 2013).

Além das duas mutações, M73K e D121N, responsáveis pelo alelo preto dominante E^D , uma outra mutação no gene *MC1R* foi identificada, o SNP (C-31G>A) (R67C) situado na região 5' não traduzida (5'-UTR) (Fontanesi *et al.*, 2010). A descoberta deste SNP possibilitou mapear os alelos expressos na população de ovelhas Massese e em diversas raças ovinas (Fontanesi *et al.*, 2010).

Outro exemplo de mutação em gene *MC1R*, associada com fenótipo escuro, ocorreu em renas. Foram identificadas duas mutações: a variação nucleotídica na posição 218 (c.218T> C) causou a troca de aminoácidos de metionina para treonina na posição 73 genotipo (Met73Thr), e uma variação (c.839T> L), causando a troca de cisteína na posição 280 por uma fenilalanina (Phe280Cys) (Vage *et al.*, 2014). Mutações no gene da melanocortina foram relatadas em outras espécies de mamíferos como bovinos (Klungland *et al.*, 1995) e suínos (Kijas *et al.*, 1998).

2.3.2. *Locus agouti*: Proteína Sinalizadora Agouti (*ASIP*)

ASIP é um gene que interage com outros diversos genes. O seu envolvimento antagonista, com o hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) e o receptor de melanocortina 1 gene *MC1R* é um evento chave para que ocorra a troca de produção de feomelanina e eumelanina nos melanócitos. A síntese da proteína agouti que é formada por 131 aminoácidos tem por finalidade agir de forma parácrina, assim sua ação resulta na interrupção da ligação do α -MSH ao receptor de melanocortina 1 (*MC1R*), desta forma a síntese do pigmento eumelanina é interrompido então ocorre a produção da feomelanina que origina cores claras. (Graham *et al.*, 1997; Sulaimon & Kitchell 2003; Wolf, 2003).

Para que ocorra interação da expressão alélica entre os *loci ASIP* e *MC1R*, é necessário que exista um alelo funcional do gene *MC1R* (Graham *et al.*, 1997; Voisey & Van Daal, 2000). Desta forma em ovinos, a ação de mutações e deleções no gene *ASIP* foram apontadas como a consequência do alelo preto recessivo não-agouti (Norris & Whan, 2008; Royo *et al.*, 2008; Gratten *et al.*, 2010).

A deleção de 5pb (g.100-104-AGGAA) situada no exon 2 do gene *ASIP* causa um *stop codon* prematuro no aminoácido da posição 64, resultando num péptido maduro que não possui o domínio de sinalização do aminoácido cisteína que é funcionalmente importante para a síntese de feomelanina. Dois SNPs foram relatados no exon 4 (G5051> C) é sinónimo não causa alterações de proteínas. Já o SNP não sinónimo (T5172>A) prevê a troca do aminoácido cisteína por serina no codon 126 situado no domínio de sinalização da proteína. Os sete resíduos de cisteína contidos no terminal 3' da sequência de aminoácidos são altamente conservados, fato esse que sugere forte restrição funcional sobre a perda ou ganho de mutações de cisteína. Deste modo, a ocorrência da deleção de 5pb juntamente com (T5172>A) são ambos susceptíveis de influenciar a função da proteína *ASIP*, como foi anteriormente proposto por Norris & Whan (2008).

Outra mutação candidata a alterar o fenótipo de ovelhas, foi identificada no exon 2 do gene *ASIP*, é a deleção de 9pb (g.10-19-AGCCGCCTC,) que esta posicionada apenas a 10pb após o codon de iniciação ATG. Essa deleção poderia resultar na perda de um tripeptídeo e consequentemente é passível de causar interferência parcial na função do gene (Norris & Whan, 2008).

Foi observado que a duplicação de 190kb que engloba o gene *ASIP* provoca aumento da sua expressão nos folículos pilosos de ovinos que possuem pelo menos uma cópia

duplicada do gene. Fisicamente, a duplicação se localiza na extremidade 5' do ponto de ruptura da duplicação e fica situada antes da região codificante do *ASIP*. O mecanismo de ação da expressão duplicada da segunda cópia da sequência do *ASIP* é regido pela região promotora duplicada da região promotora do gene *ITCH* (Norris & Whan 2008; Fontanesi *et al.*, 2009, 2011). Este evento de duplicação foi claramente associado ao fenótipo feomelanico referente a cores claras em ovinos, uma vez que animais que expressaram a duplicação possuíam pelagem branca possivelmente uma das cópias continha o alelo funcional branco dominante do locus agouti (A^{Wt}), ao contrário dos animais pretos que possuem apenas uma cópia do gene *ASIP*.

Eventos de duplicação são fontes de variação da cor em diversas espécies animais. A mesma duplicação relatada em ovinos, no gene *ASIP*, foi encontrada na espécie caprina por Fontanesi *et al.* (2009) Em suínos, foram identificadas quatro duplicações do locus de *KIT* capazes de causar fenótipo branco dominante (Rubin *et al.*, 2012). Mutações e duplicações na via de produção da cor em ovinos e bovinos foram principalmente determinadas pela interação e herança de diferentes alelos dos genes *KIT*, *ASIP*, *TYRPI* e *MC1R* (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2007; Brenig *et al.*, 2013).

2.3.3. Locus marrom: Proteína Associada à Tirosinase 1 (*TYRPI*)

O gene *TYR* transcreve a tirosinase, uma importante enzima para a fase inicial da melanogênese (Li *et al.*, 2013). A relevância da proteína *TYRPI*, assim como a *DCT*, na estabilidade e síntese de várias outras enzimas participantes na formação da melanina, mostra que alterações no gene *TYRPI* são uma importante fonte na variação normal da pigmentação (Sturm, 2004). Codificada pelo locus marrom, a proteína relacionada à tirosinase 1 (*TYRPI*) é composta por 537 aminoácidos (Zdarsky *et al.*, 1990; Rieder *et al.*, 2001), e denominada proteína de membrana dos melanossomas participando da gênese da pigmentação (Guibert *et al.*, 2004). Além da semelhança estrutural na sequência de aminoácidos, assemelham-se também na estrutura genética, pois a região promotora é conservada entre as proteínas da tirosinase, pequenas exceções ocorrem em exons e introns (Camacho-Hubner *et al.*, 2003).

Em ovinos um fragmento parcial de 750 pb situado no exon 1 do gene *TYRPI* ligado a proteína tirosinase foi investigado e revelou a existência de duas mutações sinônimas (G192C e C462T) (Deng *et al.*, 2008). Apesar de não haver nenhum efeito sobre as

sequências de aminoácidos da tirosinase, este estudo foi significativamente importante pois demonstrou que a atividade da tirosinase medida no plasma de ovinos das raças Nanping County e Romney, constatou que o genótipo (GG), descoberto na população estudada, apresentou maior atividade e correspondeu ao fenótipo escuro, enquanto que o genótipo (CC), foi associado a animais brancos e apresentou menores índices de atividade da enzima tirosinase (Deng *et al.*, 2008).

Em humanos, apenas uma alteração no gene *TYRP1*, levou a uma troca de cistina para um resíduo de arginina na proteína altamente conservada relacionada com a tirosinase 1, e foi capaz de produzir cabelos loiros na população negra da região das Ilhas Salomão (Kenny *et al.*, 2012). Em estudos com camundongos mutações no *TYRP1* foram identificadas e apontadas para alterar a densidade do pigmento eumelanina depositado nos melanossomas, levando à diluição na coloração preta, culminando no fenótipo marrom (Gratten *et al.*, 2007).

3. Diversidade genética e Conservação Recursos Genéticos Animais (CRGA)

Diversidade genética pode ser descrita como as expressões da variação das diferenças fenotípicas percebidas nos organismos, que ocorrem em razão da variedade genotípica de cada indivíduo. Portanto a diversidade genética entre animais de um mesmo grupo da mesma espécie dentro de uma população ou entre populações, não é contínua, e sim variável e dependente de eventos ecológicos evolutivos. Esses processos englobam a adaptação dos indivíduos às diversificadas condições edafoclimáticas da localidade em que são inseridos (Ayala, 1982; Halliburton *et al.*, 2004).

A diversidade genética pode ser mensurada entre populações, dentro de populações, entre indivíduos de uma mesma espécie e entre populações diferentes, porém as forças evolutivas que agem na determinação da variabilidade genética permanecem sendo as mesmas nas diferentes situações. Deriva genética, seleção natural e migração são alguns dos fatores naturais que afetam as manifestações da diversidade entre grupos de espécies animais (Flashman *et al.*, 2001).

A mensuração de parâmetros de diversidade padrão, como estimativa de variabilidade alélica por *locus* polimórficos, e heterozigidade são alguns fatores que revelam o grau de diversidade genética existente na população decorrente da atuação das

forças evolutivas. Proporcionalmente, diferenças no grau de diversidade genética do organismo podem contribuir para melhor adaptação ao meio em que vivem (Beaumont, 1999).

As raças localmente adaptadas geralmente apresentam melhor grau de adaptação às condições edafoclimáticas locais. Devido a menor exigência na implantação de tecnologia de produção e boa taxa de sobrevivência frente a condições adversas, estas raças são escolhidas para manutenção da subsistência do homem (Gularte *et al.*, 2003; Fogarty *et al.*, 2006). Desta forma a máxima produtividade exibida por raças comerciais, visando à alta produtividade pode ser refletida pela interação da resposta produtiva animal, frente ao tipo de manejo e grau de tecnificação adotado no sistema de produção (McManus *et al.*, 2011). Porém se comparadas às raças localmente adaptadas, as raças comerciais geralmente possuem menor grau de adaptação às regiões onde são criadas. Em contrapartida as raças localmente adaptadas são pouco especializadas na produção intensiva de carne, leite. Porém geralmente possuem maior grau de resistência a endoparasitas e ectoparasitas. (Mariane & Cavalcante, 2006). A conscientização da manutenção e uso racional das raças localmente adaptadas ao Brasil, torna-se necessária para que futuramente exista diversidade de Recursos Genéticos Animais (RGA), suficiente para suprir as necessidades de mercado que possam surgir. Deste modo, mensurar e garantir a expressividade da diversidade genética são alguns parâmetros que compõem os planos de ação em prol da conservação e manutenção de recursos genéticos animais. O Plano de Ação Mundial para Recursos Genéticos Animais, é um tratado internacional que reúne diretrizes voltadas ao combate da perda da diversidade genética animal no âmbito mundial. Essa importante ação conta com a participação de 169 países que se comprometeram com a conservação dos (RGA). Ao adotarem a Declaração de *Interlaken*, foi firmado um marco de esforços múltiplos e individuais pela conservação de Recursos Genéticos Animais, pelo uso sustentável de raças nativas, em prol da melhoria da agricultura, pela segurança alimentar mundial e desenvolvimento rural (FAO, 2010).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCO. **Associação Brasileira de Criadores de Ovinos**. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/racas_links/crioula.htm>. Acesso em: 20 junho.2013.
- AYALA, F.J. **Population and Evolutionary Genetics: A primer**. The Benjamin Cummings Pub. Co Inc, California, 268p,1982.
- BARSH, G., GUNN, T., HE, L. SCHLOSSMAN, S. DUKE-COHAN, J. Biochemical and genetic studies of pigment-type switching. **Pigment Cell Research**, v.13, p.48–53, 2000.
- BEAUMONT, M.A. Detecting population expansion cline using microsatellites. *Genetics*. n. 153, 2013-2029.1999.
- BEAUMONT KA, SHEKAR SN, NEWTON RA, JAMES MR, STOW JL, DUFFY DL AND STURM RA. Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for *MC1R* variant alleles. **Hum Mol Genet** 16:2249–2260, 2007.
- BENNETT DC, LAMOREUX ML. The color *loci* of mice a genetic century **Pigment Cell Res** 16: 333–344. **Beddard F.E. Animal Coloration**, 2nd ed. Swan Sonnenschein, London; 1895,2003.
- BRENIG,B.,BECK,J.,FLOREN,C.,BORNEMAN,KOLATZKI,K.,WIEDEMANN,I.,HENNECKE, S., et al. Molecular genetics of coat colour variations in white gallo way and white park cattle. *Anim. Genet.* 44, 450–453. doi:10.1111/age.12029, 2013.
- CALVO J.H., J.A. BOUZADA , J.J. JURADO , M. SERRANO et al. Genetic substructure of the Spanish Manchega sheep breed. *Small Ruminant Research* 64. 116–125, 2006.
- CAMACHO-HÜBNER A, RICHARD C, BEERMANN F. Genomic structure and evolutionary conservation of the tyrosinase gene family from Fugu. **Gene** 285:59-68, 2003.
- CHEN S Y, HUANG Y, ZHU Q, Sequence characterization of the MC1R gene in yak (*Poephagus grunniens*) breeds with different coat colors. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, doi: 10.1111/age.12191, 2014.
- CORSO JOSMAEL. O gene MC1R e a pigmentação dos animais. *Genética na Escola*, Vol. 8, número 2, 2013.

- DENG WD, SHU W, YANG SL, SHI XW AND MAO HM .Pigmentation in black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the Tyrosinase gene. **Mol Biol Rep** 35:379-385, 2008.
- DENG WD, SHU W, YANG SL, SHI XW AND MAO HM .Pigmentation in blackboned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the MC1R gene. **Mol Biol Rep** 36:431-436,2009.
- FAO. **Breeding strategies for sustainable management of animal genetic resources**. Rome 132 p. (FAO animal production and health guidelines, n. 3), 2010
- FLASHIMAN,E; LAUNER,A.E;SWITY,K.R Rules and exception in conservation genetis: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning BIOLOGICAL CONSERVATION, Essex, v.98,p45-53, 2001.
- FOGARTY, N. M.; INGHAM, V. M.; MCLEOD, L.; GAUNT, G. M.; CUMMINS, L. J. Genetic resources to increase the profitability of crossbred lamb production. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Melbourne, v. 46, p. 799-802, 2006.
- FONTANESI L, TAZZOLI M, BERETTI F AND RUSSO V.Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Anim. Genet.** **37: 489-493**. 2006.
- 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 evidences. **BMC Genet.** **10: 47**. 2009.
- FONTANESI L, F L, ALLAIN D, SCOTTI E, BERETTI F, DERETZ-P S, P E,VERNESI C, ROBINSON TJ, MALANEY JL, RUSSO V AND OULMOUDEN A Characterization of the rabbit agouti signaling protein (*ASIP*) gene: Transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. **Genomics** 95:166-175, 2010
- FONTANESI L, DALL'OLIO S, BERETTI F, PORTOLANO B AND 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* 5:8-17, 2011.
- GARCÍA BORRÓN, J.C., SÁNCHEZ-LAORDEN, B.L., JIMÉNEZ-CERVANTES, C.Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. **Pigment Cell Research**, v.18,p.393–410. 2005.
- GIRARDOT M, MARTIN J, GUIBERT S, LEVEZIEL H, JULIEN R AND OULMOUDEN A Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters. **Pigment Cell Res** 18:34-41, 2005
- GONÇALVES, G.L.; MOREIRA, G.R.P.; FREITAS, T.R.O. *et al.* Mitochondrial and Nuclear DNA Analyses Reveal Population Differentiation in Brazilian Creole Sheep. **Animal Genetics** 41.3 308-10, 2010.

- GRAHAM A, WAKAMATSU K, HUNT G, ITO S AND THODY AJ. Agouti Protein Inhibits the Production of Eumelanin and Pheomelanin in the Presence and Absence of Melanocyte Stimulating Hormone. *Pigment Cell Res* 10: 298-303, 1997.
- GRATTEN J, BERARDI D, LOWDER BV, MCRAE AF, VISSCHER PM, PEMBERTON JM AND SLATE J 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* 274:619–26, 2007
- 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.
- GUIBERT, S., GIRARDOT, M., LEVEZIEL, H., JULIEN, R., OULMOUDEN, A. Pheomelanin Coat colour dilution in french cattle breeds is not correlated with the *tyrp1* and *dct* transcription levels. *Pigment Cell Research*, v.17, p.337–345, 2004.
- GULARTE, M. A.; BESEN, S. M.; TREPTOW, R. O.; VAZ, C. M. S. L. Efeito da castração em ovinos da raça Crioula nas características sensoriais. Boletim Informativo, Porto Alegre: Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos Crioulos, n. 5, 2003.
- GUTIÉRREZ-GIL B, WIENER P AND WILLIAMS JL Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and pheomelanin pigments in an F2-Backcross Charolais × Holstein population. *BMC Genet* 8:56, 2007.
- HALLIBURTON, R. Introduction to population genetics. Pearson Education International, New Jersey. 651p, 2004.
- HAN JL, YANG M, YUE YJ, GUO TT, LIU JB, NIU CE, . Analysis of agouti signaling protein (ASIP) gene polymorphisms and association with coat color in Tibetan sheep (*Ovis aries*). *Genet Mol Res*. 14:1200–9. 2015.
- HENKES L.E., WEIMER T.A., Franco M.H.L.P. & Moraes J.C.F. Genetic characterization of the “Crioula lanada” sheep from southern Brazil. *Revista Brasileira de Genética* 16, 449-455, 1993
- HEPP D, Gonçalves GL, Moreira GRP, Freitas TRO Martins CTDC, Weimer TA and Passos D.T. Identification of the e allele at the Extension locus (*MC1R*) in Brazilian Creole sheep and its role in wool color variation. *Genet Mol Res* 11:2997-3006, 2012.
- HOEKSTRA HE AND NACHMAN MW Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice. *Mol Ecol* 12:1185-1194, 2003.
- HOEKSTRA HE, HIRSCHMANN RJ, BUNDEY RA, INSEL PA AND CROSSLAND JP A Single Amino Acid Mutation Contributes to Adaptive Beach Mouse Color **Pattern**. *Science* 313:101-104. A 2006.
- HOEKSTRA, H E Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222–34. B 2006.

- ITO S AND WAKAMATSU K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res* 16:523–31, 2003.
- ITO S AND WAKAMATSU K Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:63-74, 2011.
- KENNY EE, TIMPSON NJ, SIKORA M, YEE MC, MORENO-ESTRADA A, ENG C, HUNTSMAN S, BURCHARD EG, STONEKING M, BUSTAMANTE CD, MYLES S: Melanesian blond hair is caused by an amino acid change in TYRP1. *Science* 2012, 336:554.
- KERNS JA, NEWTON J, BERRYERE TG, RUBIN EM, et al. Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mamm. Genome*. 15: 798-808, 2004.
- KIJAS JM, WALES R, TORNSTEN A, CHARDON P, *et al* Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* **150**: 1177-1185, 1998.
- 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* **158**: 779-785, 2011.
- KIJAS JW, SERRANO M, MCCULLOCH R, LI Y, SALCES-ORTIZ J, CALVO JH, PÉREZ-GUZMÁN MD and The International Sheep Genomics Consortium Genome-wide association for a dominant pigmentation gene in sheep. *J Anim Breed Genet* 130:468-475, 2013.
- KLUNGLAND H, VAGE DI, GOMEZ-RAYA L, ADALSTEINSSON S, *et al*. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome* 6: 636-639. Cockett NE, Shay TL, Smit M (2001). Analysis of the sheep genome. *Physiol Genomics* 7:69–78, 1995.
- KLUNGLAND, H., RØED, K. H., NESBØ, C. L., JAKOBSEN, K. S. & VÅGE, D. I. The melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1-R) gene as a tool in evolutionary studies of Artiodactyles, *Hereditas*, 131, 39–46, 1999.
- KLUNGLAND H, OLSEN HG, HASSANANE MS, MAHROUS K AND VÅGE DI Coat colour genes in diversity studies. *J Anim Breed Genet* 117:217–224, 2000.
- LI, M., TIAN, S., JIN, L., ZHOU, G., LI, Y., ZHANG, Y., et al Genomic analyses identify distinct patterns of selection in domesticated pigs and Tibetan wild boars. *Nat. Genet.* 45, 1431–1438. doi:10.1038/ng.2811, 2013.
- LU, D., VAGE, D.I., CONE, R.D. A ligand-mimetic model for constitutive activation of the melanocortin-1 receptor. *Molecular Endocrinology*, v.12, p.592-604, 1998.
- MARIANTE, A. DA S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: Raças Domésticas da História do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 232 p.
- 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*, Edinburgh, v. 43, p. 121-126, 2011.

MIAO Y, WU G, WANG L, LI D, TANG S, LIANG J, . The role of MC1R gene in buffalo coat color. *Science China Life Sciences*;53:267–72, 2010

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H. **Descrição da cor da pelagem em um rebanho de ovelhas Crioulas**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2011. 27 p. (Embrapa Pecuária Sul. Documentos, 114). 2011.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H. **Uma Reavaliação dos Ovinos Crioulos Lanados sob a Ótica de Sua Conservação**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2015.15 p.(Embrapa Pecuária Sul, Documentos 141).2015.

MOREIRA GRP. **Participações históricas da ovelha crioula em exposições**. *Boletim Informativo ABCOC* 2:9-12, 2002.

MOREIRA, G. R. P. **A Cabra e a ovelha no Brasil: uma revisão crítica**. Boletim informativo, Porto Alegre: Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos Crioulos, n. 4, 2003.

MOREIRA, G.R.P., SILVA, M.C. La retomada de la crianza de ovejas criollas en el Brasil. *La Propaganda Rural*, v.1557, p.92-95, 2004.

MUNIZ, M. M. M. **Estudo de associação ampla do genoma para coloração de pelagem em ovinos da raça Morada Nova**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 58 p. Dissertação de Mestrado.

MUNDY NI. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage coloration in birds. *Proc. Biol. Sci.* 272 (1573): 1633-40, 2005

MUNDY NI. Coloration and the genetics of adaptation. *PLoS Biol* 5: 1842–1843, 2007

NORRIS BJ AND WHAN VA. A gene duplication affecting expression of the ovine *ASIP* gene is responsible for white and black sheep. *Genome Res* 18:1282-1293.2008

OTTO G.P. **Genética básica para veterinária**. São Paulo.2006.pg35 -60.2006

PIPER, L. & RUVINSKY, A. **The genetics os sheep**.Edition.Australia,New England. USA, 1997.53-55p.Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, et al. (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72,827–834,1993.

RIEDER S, TAOURIT S, MARIAT D, LANGLOIS B AND GUERIN G. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) *loci* and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) *Mamm Genome* 12:450-455, 2001.

ROUZAUD,F., MARTIN, J., GALLET, P.F., DELOURME, D., GOULEMOT-LEGER,V., AMIGUES, Y., MÉNISSIER, F., LEVÉZIEL, H., JULIEN, R., OULMOUDEN, A. 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.

- ROUZAUD, F., HEARING, V.J., Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. **Peptides**, v.26, p.1858–1870, 2005.
- ROYO LJ, ALVAREZ I, ARRANZ JJ, FERNANDEZ I, RODRÍGUEZ A, PÉREZ-PARDAL L AND GOYACHE F. Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed. **Anim Genet** 39:290-298, 2008
- RUBIN,C.J,MEGENS,H.J.,BARRIO,A.M.,MAQBOOL,K.,SAYYAB,S.,C.D(2012).Strong signatures of selection in the domestic pig genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* Available at: <http://www.pnas.org/content/early/2012/11/07/1217149109>[Accessed August 2, 2013].
- SEARLE, A.G. **Comparative Genetics of Coat Colour in mammals**, Logos Press, London, UK, 1968. Record Number 19680103237.
- SPONENBERG DP (1997). **Genetics of colour and hair texture**. In: The genetics of sheep Piper LR and Ruvinsky A, New York. pp. 51–86.1997.
- STURM, R.; FRUDAKIS,T.Eye colour:portals pigmentation genes and ancestry. **Trends in Genetics**,v.20,n8,p.327-332, 2004.
- SULAIMON, S.S., KITCHELL, B.E. The biology of melanocytes. **Veterinary Dermatology**, v.14, p.57–65, 2003.
- TAKEUCHI S, SUZUKI H, YABUUCHI M AND TAKAHASHI S. A possible involvement of the melanocortin-1 receptor in regulating feather pigmentation in the chicken. **Biochim Biophys Acta** 1308,164-168. 1996.
- VAGE DI, KLUNGLAND H, LU D, CONE RD (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. **Mammalian Genome** 10: 39.43, 1999.
- VAGE D.I., FLEET M.R., PONZ R., OLSEN R.T., MONTEAGUDO L.V., TEJEDOR M.T., ARRUGA M.V., GAGLIARDI R., POSTIGLIONI A., NATTRASS G.S. & KLUNGLAND, H. Mapping and characterization of the dominant black colour *locus* in sheep. **Pigment Cell Research** 16,693–7, 2003.
- VAGE D.I., NIEMINEN M., ANDERSON D.G & ROEDS K.H.Two missense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) are strongly associated with dark ventral coat color in reindeer (*Rangifer tarandus*) **Animal Genetics** 10.1111- 12187, 2014
- VANETTI, M., SCHÖNROCK,C., MEYERHOF, W., HÖLLT, V. Molecular cloning of a bovine MSH receptor which is highly expressed in the testis. **FEBS Letters**, v.348, p.268-272, 1994.
- VAZ, C.M.S.L., MARTINS, W.M., OLIVEIRA, N.M., LUIZ, L.S. Tipificação de uma população de ovelha crioula quanto ao velo. In: **Anais do 25° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, RS. SOVERGS Porto Alegre,. 1997. p. 267, 1997

- VAZ, C.M.S.L. **Morfologia e aptidão da ovelha Crioula Lanada. Bagé: Embrapa Pecuária Sul**, 16 p. (Embrapa Pecuária Sul. Documentos, 22), 2000.
- VAZ, C.M.S.L., MEDEIROS, F.P., MOREIRA, G.R.P. Padrão racial da ovelha crioula. **Boletim Informativo ABCOC**, v.1, p.2-5, 2002.
- VAZ, C.M.S.L., MOREIRA, G.R.P., CAON, J.E.M.A. O registro de uma raça: da ovelha crioula à homologação da Raça Ovina Crioula. **Boletim Informativo ABCOC.**, v.4, p.5-8, 2003.
- VILLELA, L.C.V. **Raças Naturalizadas**. Agência de Informações da Embrapa. 2011. Disponível: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000fxqeffv602wyiv804u7ypc406m9yj.html. Acessado em: 28 janeiro. 2014.
- VOISEY J AND VAN DAAL A .Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res* 15:10-18, 2002.
- WOLF, G.L., Regulation of yellow pigment formation in mice: A historical perspective. **Pigment Cell Research**, v.16, p.2–15, 2003.
- ZDARSKY, E., FAVOR, J., JACKSON, I.J. The molecular basis of *brown*, an old mouse mutation, and of an induced revertant to wild type. **Genetics**, v.126, p.443-449, 1990.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA COR DE PELAGEM EM OVINOS DA RAÇA CRIOULA DO SUL DO BRASIL

RESUMO

Os ovinos Crioulos são uma raça localmente adaptada do sul do Brasil que produzem uma lã medulada e naturalmente pigmentada com uma alta variabilidade de cores (preto, marrom, castanho, branco e cinza) e com potencial para uso econômico na região. A compreensão dos componentes genéticos responsáveis pela coloração nessa raça poderá auxiliar a seleção de cores específicas para nichos de mercado e/ou produtores bem como irá auxiliar na composição do Banco de Germoplasma de forma de conservar a maior diversidade genética possível para essa característica. Resultados preliminares no rebanho de conservação da raça Crioula sugerem que a diversidade fenotípica para cor de pelagem se manifesta de forma bimodal (animais com cores escuras e claras). Um total de 115 animais do Núcleo de Conservação da ovelha Crioula da Embrapa Pecuária Sul (Bagé, RS) foram analisados para polimorfismos nos genes *MC1R*, *ASIP* e *TYRP1*. Foram sequenciados um total de 953, 5.353 e 1.609 pb, respectivamente para cada gene onde, foi encontrado, um total de 14 marcadores de base única (SNPs). Adicionalmente, dois ensaios com primers fluorescentes foram realizados para detectar presença de duplicações e/ou deleções no gene *ASIP*. Apenas 7 dos 115 animais apresentaram um padrão de pelagem que não pode ser explicado pelos polimorfismos analisados nos três genes estudados. Tais resultados sugerem que a grande variabilidade fenotípica observada na raça Crioula demandará novos estudos de forma a se explicar 100% da diversidade observada. O painel de marcadores usado nesse estudo foi eficiente o suficiente para implementar um programa de seleção assistida no Núcleo de Conservação da raça Crioula de forma a se selecionar os animais que terão seu germoplasma criopreservado.

Palavras-chave: *Ovis aries*, marcadores moleculares, coloração da pelagem, *MC1R*, *TYRP1*, *ASIP*

CHAPTER 2

GENETIC CHARACTERIZATION OF COLOR COAT IN CRIOLLO SHEEP FROM SOUTHERN BRAZIL

ABSTRACT

The Creole sheep is a locally adapted breed from southern Brazil that produces a medulated and naturally pigmented wool with a high variability of colors (black, chestnut, brown, white and gray) and has potential for economic use in the region. Understanding the genetic components responsible for the color in this breed will help in the selection of specific colors for niche markets and / or will assist in the composition of the Germplasm Bank to preserve highest genetic diversity for this characteristic. Preliminary results from the conservation flock of the Creole breed suggest that phenotypic diversity in coat color manifests itself in bimodal form (animals with dark and light colors). A total of 115 sheep from the Conservation Nucleus of Creole Sheep from Embrapa South Livestock (Bagé, RS) were analyzed for polymorphisms in genes *MC1R*, *ASIP* and *TYRP1*. A total of 953; 5,353 and 1,609 bp were analysed respectively for each gene where a total of 14 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found. In addition, two fluorescent assay primers were performed to detect the presence of duplication and / or deletions in the *ASIP* gene. Only 7 of the 115 animals showed a coat pattern that cannot be explained by polymorphisms analyzed in the three genes. These results suggest that the phenotypic variability observed in Criollo requires further studies to explain 100% of the observed diversity. The marker panel used in this study was efficient for the implementation of a marker assisted selection program in Creole Conservation Center to select animals for germplasm cryopreservation.

Keywords: *Ovis aries*, molecular markers, coat color, *MC1R*, *TYRP1*, *ASIP*

1.INTRODUÇÃO

Crioula é uma raça ovina localmente adaptada à região Sul do Brasil. Esta raça, com velos medulados e naturalmente coloridos, tem grande parte do seu uso na confecção de artesanatos e tapeçaria industrial (Moreira & Silva, 2004; Arco, 2007). As cores da lã destes ovinos variam do branco ao negro, passando pelas cores marrom, castanho e cinza (Gonçalves *et al.*, 2010). A raça Crioula é mantida tanto por produtores bem como por um núcleo de conservação *in situ* localizado na Embrapa Pecuária Sul, (CPPSUL), em (Bagé RS), onde são realizados diversos estudos voltados à coloração, reprodução e manejo da raça (Moraes *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2000). A compreensão dos componentes genéticos responsáveis pela coloração nessa raça poderá auxiliar a seleção de cores específicas para nichos de mercado e/ou para produtores bem como irá auxiliar na composição do Banco de Germoplasma visando conservar a maior diversidade genética possível para essa característica fenotípica.

Resultados preliminares de análises fenotípicas da coloração da lã observada em cruzamentos direcionados no rebanho de conservação da raça Crioula sugerem que a diversidade existente se manifesta de forma bimodal quanto à classificação em cores brancas e não brancas da pelagem (Moraes *et al.*, 2011). Desta forma, no presente trabalho objetivamos utilizar o conhecimento obtido nas análises preliminares de coloração do núcleo de conservação *in situ* da raça Crioula para tentar identificar os principais polimorfismos em genes reconhecidamente responsáveis pela coloração da pelagem na espécie ovina.

A coloração da pelagem dos animais é uma característica fenotípica de natureza poligênica, porém, três genes principais destacam-se na determinação da cor da pelagem. Estudos pioneiros desenvolvidos inicialmente com ratos, revelaram a relevância dos genes *ASIP*, *MC1R* e *TRYP1* como principais responsáveis pela regulação e controle da determinação da coloração (Searle, 1968; Bennett & Lamoreux, 2003). Estes genes foram estudados em diversas espécies de animais como bovinos (Klungland *et al.*, 1995), suínos (Kijas *et al.*, 2001), ratos (Bennett *et al.*, 2003), coelhos (Fontanesi *et al.*, 2006), caprinos

(Fontanesi *et al.*, 2009), bubalinos (Miao *et al.*, 2010), iaques (Chen *et al.*, 2014) e ovinos (Han *et al.*, 2015).

ASIP e *MC1R* agem de forma epistática na espécie ovina de forma que, em geral, é necessária a presença do alelo selvagem do *MC1R* (E^+) para que o produto dos alelos do gene *ASIP* seja observado (Vage *et al.*, 1999; Fontanesi *et al.*, 2011, Hepp *et al.*, 2012).

A perda de função no gene *MC1R* causa produção de feomelanina e dá origem as cores claras, já alelos dominantes acarretam em cores escuras. (Barsh *et al.*, 2000; Klunghand e Vage, 2000; Girardot *et al.*, 2005). Ganho de função no gene *MC1R* provoca a ativação constante do receptor e resulta em cores escuras devido à produção contínua de eumelanina. Poucos estudos investigando a relação destes genes com a coloração de pelagem foram realizados em raças brasileiras de ovinos localmente adaptados, Hepp *et al.* (2012) desenvolveu um estudo a cerca da diversidade genética da cor da pelagem também em ovinos da raça Crioula. Já Muniz (2015) realizou um estudo de associação ampla do genoma com o intuito de identificar os genes envolvidos na determinação das cores da pelagem negra, branca e vermelha na raça Morada Nova. Estes tipos de estudo são de grande importância pois as raças localmente adaptadas brasileiras possuem grande importância social e econômica nos locais onde são criadas.

Deste modo almejamos com esse trabalho, aumentar a compreensão da variabilidade genética existente na coloração da lã por meio dos genes *MC1R*, *ASIP* e *TYRPI* que são responsáveis pelo controle da coloração de pelagem nas ovelhas da raça Crioula.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

Foram selecionados progenitores e suas respectivas proles (56 cruzamentos, N= 115) do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul (CPPSUL) de (Bagé RS). As proles foram classificadas por avaliação visual dos cordeiros aos 4 meses de idade e/ou após tosquia (Figura 1). Cada fase da avaliação foi fotografada para comparação (Figura 2). A fenotipagem por colorimetria do sistema Munsell foi realizada a partir de metodologia descrita por Moraes & Souza (2011).



Figura 1. Colorações de pelagens analisadas do Núcleo de Conservação de ovinos Crioulos da Embrapa Pecuária Sul. (A): Branco, (B): Branco mascarado. (C): Castanho, (D): Preto malhado, (E, F): Preto, (G, H): Preto, antes e após tosquia, (I, J): Mouro, antes e após

tosquia, (K,L): Mouro malhado, antes e após tosquia. (Fonte: Adaptado de Moraes et al., 2011). Fotos: Carlos José Hoff de Souza.



Figura 2. Método de avaliação visual da coloração da lã. Fenótipo Mouro caracterizado por fibras claras e escuras em mesclagem.(A): após tosquia. (B): antes da tosquia. (Fonte: Adaptado Moraes *et al.*, 2011) Fotos: Carlos José Hoff de Souza.

Os cruzamentos foram realizados utilizando dois grupos de classificação de coloração (Tabela 1). O grupo 1 foi composto por quatro reprodutores sendo dois machos brancos, dois machos brancos mascarado e um castanho. O grupo 2 é composto por três reprodutores, sendo dois machos de cor preta e um de coloração mouro.

Tabela 1. Resumo dos cruzamentos controlados realizados no Núcleo de conservação dos ovinos da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul.

Cruzamentos	Nº Proles cores Escuras	Nº Proles cores claras	Nº Cruzamentos
GRUPO 1			
Branco x Preto	3	2	4
Branco x Branco	-	1	1
Branco x Mouro	3	-	2
Branco x Mouro malhado	1	-	1
Branco x Branco mascarado	1	1	1
Branco mascarado x Preto	1	1	2
Branco mascarado x Branco	-	2	2
Branco mascarado x Mouro	-	1	1
Branco mascarado x Preto malhado	2	-	2
Branco mascarado x Mouro malhado	1	-	1
Castanho x Branco	1	2	3
GRUPO 2			
Preto x Preto	11	7	16
Preto x Mouro	1	1	2
Preto x Preto malhado	1	1	2
Preto x Mouro malhado	3	2	5
Mouro x Preto	3	2	5
Mouro x Mouro	-	1	1
Mouro x Preto malhado	2	2	4
Mouro x Mouro malhado	1	-	1
Total	-	-	56

Amostras de sangue de cada animal foram coletadas em tubos Vacutainer[®] contendo EDTA. Os tubos foram centrifugados há 10 minutos por 3.000rpm para separar as hemácias dos linfócitos, que por sua vez, foram mantidos em tubos Eppendorf[®] sob refrigeração até o momento da extração do DNA.

2.2. Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo modificado de Miller *et al.* (1988). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop ND1000[®]) ou em gel de agarose 1% acrescido de 5 µl brometo de etídeo, submetido à tensão de 200V e 300mA e submergidos em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA) por pelo menos 1 hora. Os resultados foram fotodocumentados em transiluminador UV-EagleEye II Stratagene[®].

2.3. Padronização da Amplificação dos Fragmentos de DNA

Foram feitos ensaios, baseados na técnica de PCR (reação em cadeia da Polimerase), em busca de polimorfismos de nucleotídeos de base única (SNP), nos genes *MC1R*, *TYRP* e *ASIP*. As reações de amplificação via PCR, foram realizadas em volume final de 20 µl, a proporção de DNA molde utilizada foi de 3ng/µl, cerca de 10 pmol de cada iniciador foi utilizado juntamente com o tampão PCR-1x, dNTPs 2 mM, e 1U de DNA polimerase (Fermentas[®]).

Os ciclos padrão das reações de PCR foram de: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de amplificação de 30 segundos a 95° seguida de 30 segundos de temperatura de anelamento para cada iniciador e mais 30 segundos a 72°C, seguidos pela finalização por 5 minutos a 72°C. As proporções de magnésio (MgCl₂) e temperatura de anelamento para cada iniciador estão descritas na Tabela 3. Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% previamente corados com brometo de etídeo e acrescidos de padrão de comprimento de pb conhecidos de ladder e lambda DNA. Posteriormente foram visualizados em transiluminador.

Os parâmetros referente aos iniciadores utilizados nas ampliações dos genes *ASIP MC1R* e *TYRP1* e condições de amplificação dos ensaios de PCR, como quantidade de magnésio estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores utilizados na amplificação dos genes *ASIP MC1R* e *TYRP1* e condições de amplificação dos ensaios de PCR.

Iniciadores	Gene	Região	Sequências 5' 3'	T.A*	MgCl ²	pb	Referências
Asip_F2	ASIP	Exon 2	ACACTGGGCTGTGGGATG	62°C	1.5	410	Gratten et al. (2010)
Asip_R2			AGGGACACTTGATTCCCTCCA				
Asip_F3	ASIP	Exon 3	CTCTTTGCTGTCAGTCTCTGG	60°C	2.0	391	Gratten et al. (2010)
Asip_R3			TGGTAGCTTTCTGTTTCTCTGG				
Asip_F4	ASIP	Exon 4	CAGCTAGGGTGCTCTGTGG	60°C	1.5	650	Gratten et al. (2010)
Asip_R4			AGCCTCAGGGCTAAGCAAC				
Agt_8b	ASIP		AACAGGTTTCATGGAAGAATTG				
Agt_7b	ASIP	Deleção	6Fam.CTACCTGACTGCCTTCTCTG	55°C	2.0	165	Norris & Whan (2008)
						174	
Agt 1	ASIP		CATTACTGGGGACCTATCAAC				
Agt 11	ASIP		TATCGGCTTGGAGAGTGTTTG				
Agt_16b	ASIP	Duplicação Gene Asip	6Fam.AGCAATGAGGACGTGAGTTT	60°C	2.0	238	Norris & Whan (2008)
						242	
Agt_17b			GTTTCTGCTGGACCTCTTGTTT				
Agt_18b			GTGCCTTGTGAGGTAGAGATGGTGT				
Font_F1	MC1R	Exon 1	AGTGCCTGGAGGTGTCCATCC	64°C	2.5	169	Fontanesi et al. (2010)
Font_R1			CTGACGCTCACCAGCAAGT				
Font_F2	MC1R	Exon 1	AGCCATGAGTTGAGCAGGAC	62°C	1.0	376	Fontanesi et al. (2010)
Font_R2			CAGGACACCAGCCTCCAG				
Font_F3	MC1R	Exon 1	GTGAGCGTCAGCAACGTG	61°C	1.5	366	Fontanesi et al. (2010)
Font_R3			ACATAGAGGACGGCCATCAG				
Font_F4	MC1R	Exon 1	GCCTGGTTGGCTTCTTCATA	58°C	2.5	456	Fontanesi et al. (2010)
Font_R4			TGGTCTAGCGATCCTCTTTG				
Tyrp_EX1F	TYRP1	Exon 1	TGGCTGTTTTGTACTGCCTG	58°C	1.5	750	Deng et al.(2008)
Tyrp_EX1R			CCCTCCCATGTACTCATCTGT				
Tyrp_EX4F	TYRP1	Exon 4	TGCAGGATCCTTCTTTCTCC	58°C	2.5	400	Gratten et al. (2007)
Tyrp_EX4R			TGAATATCTGTACATCCGTTCTCT				
Tyrp_INT_F	TYRP1	Exon1	CAAGAGCCTGATGGAGAAGGA	60°C	2.0	425	Deng et al.(2008)
Tyrp_INT_R			CATTAACAGGGGCGTTGTTC				

*T.A = temperatura de anelamento / Mgcl² = proporção de magnésio / pb = pares de bases.

2.4. Sequenciamento, edição e análise dos genes *ASIP*, *MC1R* e *TYRP1*

Os amplicons padronizados foram purificados seguindo o protocolo do fabricante (versão 3 Applied Biosystems usando Exo-SAP[®]). Foi utilizado de 30 a 50 ng do produto amplificado e acrescido 0,5U das enzimas Exonuclease I (Exo) e SAP Fosfatase Alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). A solução foi homogeneizada e submetida por 30 minutos à 37°C e mais uma etapa de inativação enzimática à 80°C por 20 minutos.

As reações de sequenciamento foram realizadas com a proporção de 0,5µl de Big Dye (*Applied Biosystems*) e tampão 5x para cada amostra. Cada iniciador foi diluído a 1,6µM, e 2 µl foi utilizado na reação juntamente com até 50ng de DNA purificado. O ciclo de amplificação foi um minuto de desnaturação à 96°C, 25 ciclos de desnaturação por 10 segundos à 96°C e temperatura de anelamento dos iniciadores por 5 segundos à 50°C com extensão de 4 minutos à temperatura de 60°C.

As reações de sequenciamento foram purificadas com 3,0µl de EDTA em concentração de 125 µM e 25µl de etanol absoluto. Após incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, foram centrifugadas à 4°C por 30 minutos à 3.000rpm. Em seguida foi adicionado 30µl de etanol 70% e, novamente, centrifugado por 15 minutos a 3.000 rpm. A remoção do excedente do etanol 70% ocorreu por 15 minutos. Dez microlitros de formamida (Hi-Di) foram adicionados às amostras. A desnaturação das fitas de DNA foi feita por 5 minutos a 95°C. As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciadores ABI Prism 3100 Genetic Analyzer[®] ou ABI 3730 DNA Analyzer[®] (*Applied Biosystems*).

O sequenciamento de DNA foi realizado em 115 amostras de ovinos da raça Crioula do rebanho do núcleo de conservação da Embrapa Pecuária Sul para os genes *MC1R*, *ASIP* e *TYRP1*. Foram sequenciados 953pb da região codificante do gene *MC1R* e 5.353pb e 1.609p para os demais genes. As sequências referências utilizadas constam no banco de dados do GenBank são elas *MC1R* Y13965, *ASIP* EU420022 e duas para o gene *TYRP1* EF102109 e DQ530058.

Os dados brutos do sequenciamento foram pré-analisados no programa Sequence Analysis v.3 (*Applied Biosystems*) e editados com a utilização do programa

SeqScape[®] v.2.5 (*Applied Biosystems*). A estimativa dos haplótipos bem como a quantificação dos níveis de diversidade genética foram realizadas utilizando o programa Arlequin 2000 v.3.5. O algoritmo utilizado foi (ELB) *Elastic Load Balancing*. (Excoffier & Lischer 2010).

2.5. Análise de fragmentos para identificar deleções e duplicações no gene *ASIP*

Dois ensaios com iniciadores marcados com fluorescência foram realizados com o objetivo de identificar as deleções e duplicações no gene *ASIP* (Figuras 3 e 4). O ensaio da duplicação no exon 2 foi realizado com iniciador 5' marcado com fluorescência 6-FAM (Agt 16, Tabela 2) juntamente com um par de iniciadores direto e reverso (Agt 17 e Agt 18). Para confirmar a presença ou ausência das deleções de 5pb (g.100-105delAGGAA) e 9pb (g.10-19delAGCCGCCTC) situadas também no exon 2, foram empregados os iniciadores Agt 7 marcado com fluorescência 6-FAM, Agt 8 não marcado e Agt 1 e Agt11. A deleção de 9pb (g.10-19delAGCCGCCTC) causa a perda de um tri-peptídeo capaz de afetar a função de transporte do gene *ASIP*. A deleção de 5pb pode resultar em um *stop codon* prematuro.

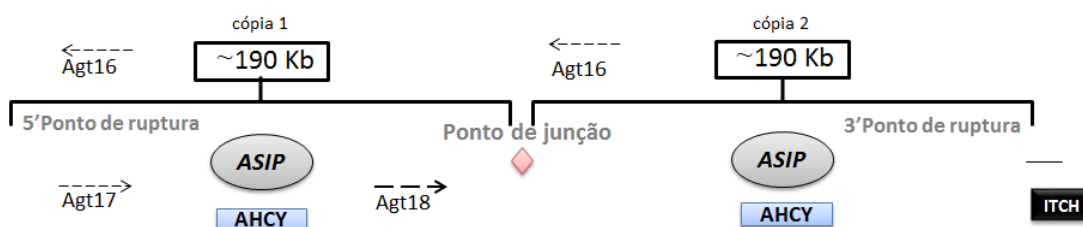


Figura 3. Duplicação de ~190kb situada no *locus ASIP*, que abrange a região de codificação *AHCY* e promotora *ITCH*. Figura adaptada de Han *et al.* (2015).

Os ensaios para detectar a presença ou ausência das deleções de 5 e 9 pb situadas no exon 2 do gene *ASIP*, revelaram dois tamanhos diferentes de amplicons: 165 e 174pb referente aos 5pb e 9pb respectivamente (Figura 4).

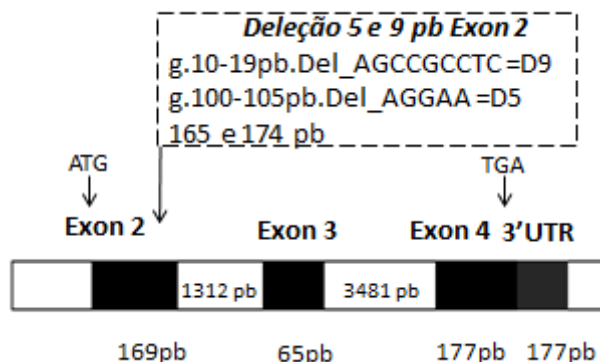


Figura 4. Estrutura simplificada e esquemática do gene *ASIP*. Blocos negros representam os exons e brancos, os introns. Figura adaptada de Norris & Whan, (2008).

A eletroforese da PCR do ensaio de detecção da duplicação revelou amplicons de dois diferentes tamanhos: 242pb originado do anelamento dos iniciadores Agt16R–FAM marcado e Agt18F, (Figura 3) responsáveis pela junção entre as cópias duplicadas; e 238pb, originado do anelamento dos iniciadores Agt16R e Agt17F, referente a amplificação da região de sequência 5' anterior ao ponto de duplicação. A presença exclusiva do fragmento de 238pb indica a ausência de duplicação. (Norris & Whan 2008). Dessa forma, a amplificação de ambos os fragmentos confirma a existência de pelo menos uma cópia duplicada do gene *ASIP*.

Os produtos de PCR para genotipagem para os eventos de deleção foram preparados a partir de 1µl da reação de PCR da região de interesse, 1µl de marcador de peso molecular Rox[®] com fluorescência (carboxi-x-rodamina) e 8µl de formamida Hi-Di totalizando volume final de 10 µl. Essa mistura foi desnaturada por 5 minutos a 95°C. As amostras permaneceram no gelo por 5 minutos.

As amostras foram analisadas no sequenciador ABI 3730[®] (*Applied Biosystems*) e o programa Genemapper (*Applied Biosystems*) foi utilizado na inferência dos alelos a partir da estimativa do tamanho dos fragmentos. O programa Action foi utilizado para inferir sobre as análises estatísticas, tabela de contingência e Qui-quadrado. (Equipe Estatcamp, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados

Foi realizada avaliação visual da coloração da lã de 115 animais da raça Crioula do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul (CPPSUL) destes 68,7 % foram classificados em cores escuras (preto, preto malhado, mouro e mouro malhado) e 31,3% classificados em cores claras (branco, branco mascarado e castanho). A cor mais frequente foi o preto 43,4% e a menos frequente o castanho (0,86%) (Figura 5). Desta forma a classificação dos animais quanto à cor da lã os dividiu em dois grupos de coloração: animais brancos e não brancos.

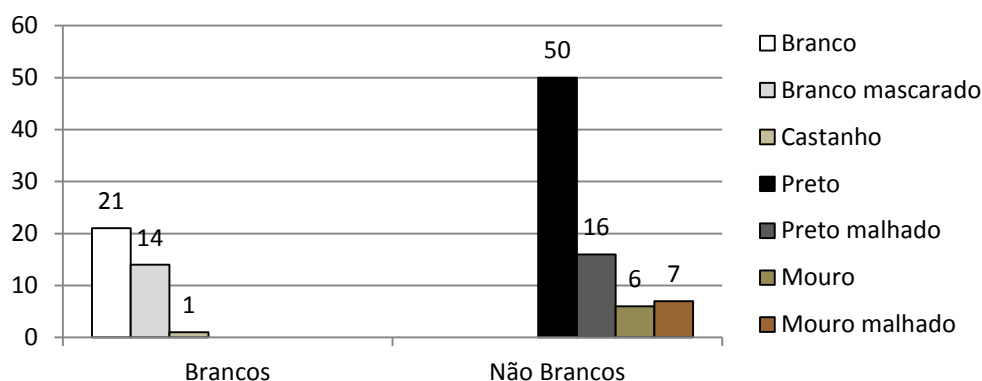


Figura 5. Distribuição dos animais em relação à cor da pelagem no rebanho de ovinos da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul .

3.1.1. Polimorfismos no gene *MC1R*

Foram identificados cinco sítios polimórficos no gene *MC1R*, três deles são substituições sinônimas c.429C> T; c.600T> G; c.735T> C .(Fontanesi *et al.*, 2010). Os

outros dois polimorfismos são c.218T>A e o c.361G>A provocam alterações de aminoácidos p.M73K e p.D121N (Vage *et al.*,1999). A partir dos polimorfismos de base única (SNPs) encontrados foram montados seis haplótipos (Tabela 3).Foram utilizados 43 cruzamentos, totalizando 98 animais.

Tabela 3. Relação dos haplótipos do gene *MC1R* identificados a partir do sequenciamento de 953pb.

Haplótipos						
Nº	T218A	G361A	C429T	T600G	C735T	Frequências
H1	T	G	C	G	C	0,010309
H2	T	G	C	T	C	0,576652
H3	T	G	T	G	T	0,103760
H4	A	G	T	G	T	0,005155
H5	A	A	C	T	C	0,005822
H6	A	A	T	G	T	0,298302

A ocorrência dos SNPs c.218T>A e c.361G>A causam a troca de um aminoácido metionina por uma lisina na posição 73 (M73K) e um ácido aspártico por uma asparagina na posição 121 respectivamente. Estas substituições resultam no alelo preto dominante (E^D) do gene *extensão MC1R*. O alelo selvagem (E^+) é representado pelos códons não mutados nas posições 73 e 121. Os haplótipos H5 e H6 são os que representam o alelo preto dominante E^D . As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas podem ser observadas, nos grupos de cores dos animais, nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para os alelos E^D e E^+ dentro do loco de extensão *MC1R* para diferentes colorações de pelagens identificadas nos ovinos Crioulos do Núcleo de Conservação da Embrapa Pecuária Sul.

Coloração da lã	N	Frequência Alélica		Frequência Genotípica		
		E^D	E^+	$E^D E^D$	$E^D E^+$	$E^+ E^+$
Branco	21	-	0,183	-	-	0,183
Branco mascarado	14	0,004	0,118	-	0,009	0,112
Castanho	1	-	0,009	-	-	0,009
Preto	50	0,182	0,252	0,052	0,261	0,121
Preto malhado	16	0,061	0,078	0,017	0,087	0,035
Mouro	6	0,026	0,026	0,009	0,035	0,009
Mouro malhado	7	0,017	0,044	-	0,035	0,026
Total	115	0,29	0,71	0,078	0,427	0,495

Como esperado, o alelo dominante E^D foi praticamente observado apenas nos animais de coloração escura (não brancos), houve uma excessão a presença do genotipo em heterozigose ($E^D E^+$) em que o animal carregava uma cópia do alelo E^D , este ovino foi classificado como Branco mascarado. A distribuição das frequências absolutas dos haplótipos identificados para *MC1R* no rebanho de conservação da ovelha Crioula podem ser observados na tabela 5. O alelo selvagem E^+ foi mais de duas vezes frequente nessa população (71%) mesmo com menor número de animais com coloração Branca. Todas as associações entre indivíduos portadores de alelo selvagem E^+ e a coloração branca e animais de coloração escura (não brancos) ao alelo E^D foram significativas ($P>0,05$).

Tabela 5. Distribuição das frequências absolutas dos haplótipos identificados para loco de extensão *MC1R* para diferentes colorações de pelagens identificadas nos ovinos crioulos do Núcleo de Conservação da Embrapa Pecuária Sul.

Coloração da lã	Nº	H1	H2	H3	H4	H5	H6
Branco	21	2	36	4	-	-	-
Branco mascarado	14	-	22	6	-	-	-
Castanho	1	-	2	-	-	-	-
Preto	50	-	47	35	1	24	40
Preto malhado	16	-	18	10	-	10	14
Mouro	6	-	4	5	-	3	6
Mouro malhado	7	-	10	4	-	4	4
Total	115	2	139	64	1	41	64

O haplótipo (H2) representa a sequência selvagem do gene *MC1R*, esteve presente em ovinos com fenótipos branco e preto. O haplótipo H6 representa a sequência do tipo preto dominante homozigoto e foi observado em animais, preto, preto malhado e mouro.

3.1.2. Polimorfismos no gene *ASIP*

Foram identificados sete SNPs do gene *ASIP* no rebanho de conservação da ovelha Crioula do CPPSUL. Dois destes SNPs foram localizados no exon 4 (g.5051G>C; é sinônimo) e (c.5172T>A não é sinônimo e causa uma alteração de

cisteína para serina C126S) (Norris *et al.*, 2008; Gratten *et al.*, 2010) e o restante dos SNPs foram encontrados em introns. O SNP (c.251G>A, esta situado no intron 2) e os demais foram identificados no intron 3 (c.4969G>T, c.49991A>C, c.5275C>A, c.5350T>C e c.5051G>C). Não foram identificados polimorfismos no exon três. Devido à presença de uma duplicação de 190kb que engloba o gene *ASIP*, não foram montados haplótipos, pois o modelo experimental usado neste estudo não permitiu detectar maiores detalhes quanto a distinção entre cópias duplicadas homozigotas e heterozigotas. Devido a esse fato, somente as frequências alélicas e genotípicas foram calculadas (Tabela 6). Considerando que o SNP (c.5172T>A) já foi reconhecidamente associado a coloração da pelagem branca Norris, (2008) um teste de associação foi realizado. Houve associação entre o polimorfismo e a coloração da lã ($P > 0,05$).

Tabela 6. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para SNPs identificados no gene *ASIP* do Núcleo de Conservação da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul.

SNPs <i>ASIP</i>	N	Frequências alélicas		Frequências genotípicas		
G251A	230	A (0,33)	G (0,67)	GG (0,4174)	GA (0,4957)	AA (0,0870)
G4969T	230	G (0,41)	T (0,59)	GG (0,4000)	GT (0,3913)	TT (0,2087)
A4991C	230	C (0,31)	A (0,69)	AA (0,4348)	AC (0,5130)	CC (0,0522)
G5051C	230	C (0,41)	G (0,59)	GG (0,2957)	GC (0,6000)	CC (0,1043)
T5172A	230	A (0,33)	T (0,67)	TT (0,4000)	TA (0,5391)	AA (0,0609)
C5275A	230	A (0,39)	C (0,61)	CC (0,3217)	CA (0,5739)	AA (0,1043)
T5350A	230	A (0,01)	T (0,99)	TT (0,9825)	TA (0,0175)	-

3.1.3. Genotipagem duplicação do gene *ASIP*

A genotipagem foi realizada para detectar a presença ou ausência da duplicação de pelo menos uma cópia duplicada do gene *ASIP*. A amplificação do fragmento de DNA da região da sequência 5' referente ao ponto de ruptura (Figura 6) gerou um amplicon com 238pb que representa os animais que não possuem a duplicação (A^{ND}). Dos 115 animais genotipados, 36 (31%) não apresentaram a duplicação. A amplificação da região responsável pela junção entre as cópias duplicadas gerou um fragmento de 242pb. A amplificação simultânea dos dois fragmentos, 238 e 242p (A^D) foi observada em 79 (69%) animais.

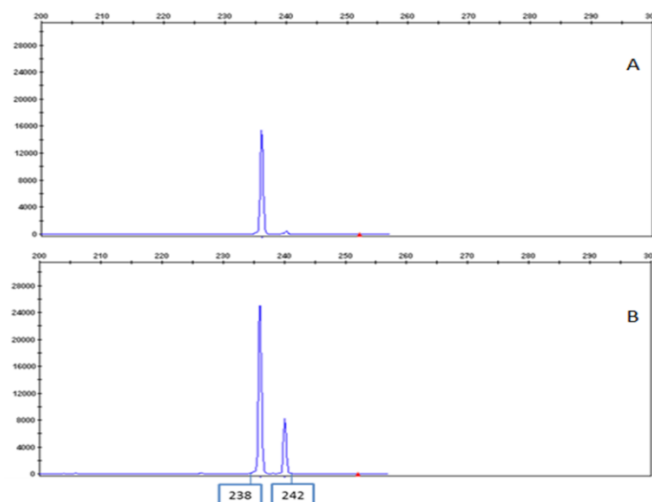


Figura 6. Eletroferogramas da análise de fragmentos para identificar a duplicação do gene *ASIP* em ovinos da raça Crioula. A=fragmento de 238pb ausência de duplicação (A^{ND}) B=fragmentos 238 e 242pb caracteriza presença de pelo menos uma cópia duplicada do gene *ASIP* (A^D).

3.1.4. Genotipagem deleções (*D5* e *D9*) no exon2 do gene *ASIP*

Dois deleções foram encontradas no exon 2, são elas as deleções de 5pb (g.100-104del-AGGAA) e 9pb (g.1019del-AGCCGCCTC). A presença das deleções foi representada pelas siglas *D5* e *D9* e a ausência por *N*. Foram encontrados cinco genótipos: *NN*/*D9N*/*D5N*/*D5D5*/*D5D9N* (Figura 7).

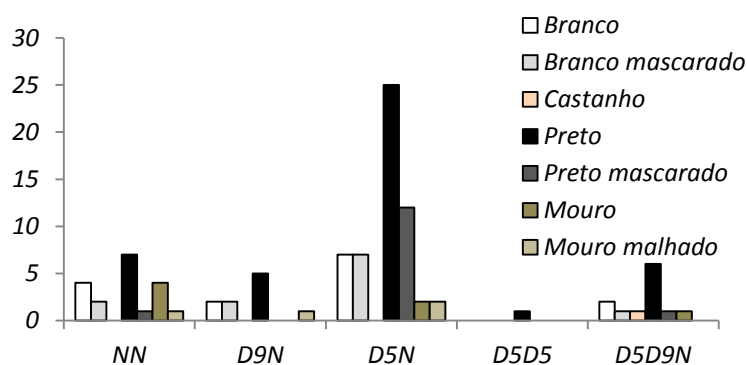


Figura 7. Distribuição da presença e ou ausência das deleções existentes no exon 2 do gene *ASIP* observadas em diferentes cores de lã de ovinos Crioulo da Embrapa Pecuária Sul.

3.1.5. Polimorfismos no gene *TYRPI*

Foram sequenciados 1.609pb da região codificadora do gene *TYRPI* foram identificados no exon 1 duas variações nucleotídica de natureza sinônima (192G>C e 463C>T) quatro haplotipos foram observados (Tabela 7). As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas estão descritas nas Tabelas 8 e 9. O SNP G869T situado no exon 4, relatado por Gratten *et al.*, (2007) não foi encontrado neste estudo.

Tabela 7. Relação dos haplótipos do gene *TYRPI* identificados a partir do sequenciamento de 1,609 pb.

Haplótipos Nº	G192C	C463T	Frequência
H1	G	C	0.764117
H2	G	T	0.014144
H3	C	C	0.075014
H4	C	T	0.146726

Tabela 8. Distribuição das frequências alélica e genotípica dos SNPs identificados no gene *TYRPI* em ovinos com diferentes colorações de pelagens do Núcleo de Conservação da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul

Cores da Lã	Nº	SNP G192C					SNP C462T				
		Freq. Alélica		Freq. Genotípica			Freq. Alélica		Freq. Genotípica		
		G	C	GG	CC	GC	C	T	CC	TT	CT
B	21	0,17	0,02	0,15	-	0,03	0,18	-	0,18	-	-
BM	14	0,10	0,03	0,08	0,01	0,03	0,10	0,02	0,09	0,01	0,03
C	1	0,01	-	0,01	-	-	0,01	-	0,01	-	-
P	50	0,32	0,11	0,24	0,03	0,16	0,34	0,10	0,25	0,01	0,17
PM	16	0,12	0,02	0,10	-	0,04	0,12	0,02	0,10	-	0,03
M	6	0,03	0,02	0,02	-	0,03	0,04	0,01	0,03	-	0,03
MM	7	0,04	0,02	0,03	0,01	0,03	0,05	0,01	0,04	-	0,02
Total	115	0,78	0,22	0,62	0,05	0,33	0,84	0,16	0,70	0,02	0,28

Tabela 9. Distribuição das frequências absolutas dos haplótipos identificados para *TYRP1* em diferentes colorações de pelagens identificadas nos ovinos Crioulos do Núcleo de Conservação da Embrapa Pecuária Sul.

Coloração da lã	Nº	H1/H1	H1/H2	H1/H3	H1/H4	H2/H4	H3/H3	H3/H4	H4/H4
Branco	21	17	-	4	-	-	-	-	-
Branco mascarado	14	9	-	1	3	-	-	-	1
Castanho	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Preto	50	25	2	2	16	1	1	3	-
Preto malhado	16	11	-	1	4	-	-	-	-
Mouro	6	2	-	1	3	-	-	-	-
Mouro malhado	7	3	-	2	1	-	-	1	-
Total	115	68	2	11	27	1	1	4	1

3.1.6. Interação entre os polimorfismos dos genes *ASIP* e *MC1R*

As distribuições de todos os polimorfismos identificados nos genes *ASIP* e *MC1R* sugerem, como esperado, uma interação entre eles mesmos (Tabela 10). Em termos gerais a coloração negra em ovinos pode ser devida a presença de um alelo recessivo não-agouti (A^a) no loco agouti (gene *ASIP*) ou a presença do alelo dominante do loco de extensão E^D (gene *MC1R*). A partir dessa premissa foi possível confirmar que todos animais claros (N=37) apresentaram a duplicação do gene *ASIP*, o que pode indicar que pelo menos uma cópia duplicada contém alelo dominante/ selvagem (A^{wt}) que acarreta na produção de feomelanina e, ao mesmo tempo, apresentaram o alelo selvagem E^+ para o gene *MC1R*. Conforme mencionado anteriormente, a exceção para este padrão foi a ocorrência de um animal branco mascarado com uma cópia do alelo dominante do loco de extensão (E^D). Contudo, este animal não possuiu nenhuma das mutações que acarretam o alelo recessivo não-agouti (apresenta a duplicação do gene *ASIP*, porém não apresenta deleção *D5* nem a mutação A na posição T5172A do exon 4).

Dos 36 animais coloridos que não apresentaram duplicação no gene *ASIP*, apenas cinco não se encaixaram no modelo básico de interação explicado acima. Ou seja, quatro animais pretos e um preto mascarado foram homocigotos para o alelo selvagem E^+ para o gene *MC1R* e não apresentaram nenhum alelo recessivo não aguti (A^a) para *ASIP*. Dos 79 animais com a duplicação para gene *ASIP*, 42 foram coloridos

(Tabela 10). Destes, apenas um animal preto não correspondeu as predições, visto que além de homozigoto para o alelo selvagem E^+ para o gene *MC1R* e não apresentaram nenhum alelo recessivo não agouti (A^a) para *ASIP*, apresentou a duplicação para o mesmo. Todos os sete animais citados (1 coloração clara e 6 coloridos) apresentaram pelo menos uma cópia do Haplótipo H2 do gene *MC1R* (mais frequente) de forma que não aparenta que esses desvios tenham sido por causa de algum polimorfismo adicional do gene *MC1R*. O mesmo é verdade para o gene *TYRP1*, onde não se observou presença de nenhum haplótipo específico nesses animais.

Tabela 10. Associação das cores de pelagens observadas nos animais da raça Crioula da Embrapa Pecuária Sul com os polimorfismos nos genes *ASIP* e *MC1R*

Duplicação Gene ASIP	Polimorfismos ASIP	Genótipo	Número de Animais							Total
			Branco	Branco Mascarado	Castanho	Preto	Preto Mascarado	Mouro	Mouro Malhado	
Ausência	Deleções Exon 2	<i>D₅N</i>	-	-	-	12(7)*	6(2)*	-	1(1)*	18
		<i>D₉N</i>	-	-	-	2(1)*	-	-	-	2
		<i>NN</i>	1	-	-	3(2)*	1(1)*	2(1)*	1	7
		<i>D5D5</i>	-	-	-	1(1)*	-	-	-	1
		<i>D5D9N</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
		Total	1	-	-	18	7	2	2	29
	Exon 4 (g.5172T>A)	<i>TT</i>	-	-	-	8(5)*	1	-	-	9
		<i>TA</i>	1	-	-	7(5)*	5(2)*	2 (1)*	1	15
		<i>AA</i>	-	-	-	3(1)*	1	-	1	5
		Total	1	-	-	18	7	2	2	29
	Presença	Deleções Exon 2	<i>D₅N</i>	7	7	-	13(11)*	6	2(2)*	1 (1)*
<i>D₉N</i>			2	2	-	3 (2)*	-	-	1(1)*	4
<i>NN</i>			4	2	-	4 (4)*	-	1 (1)*	-	5
<i>D5D5</i>			-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D5D9N</i>			2	1	1	6(6)*	1	1(1)*	-	8
Total			15	12	1	26	7	4	-	37
Exon 4 (g.5172T>A)		<i>TT</i>	5	2	-	14(12)*	5(5)*	1(1)*	1(1)*	20
		<i>TA</i>	9	9	1	12(11)*	2(2)*	-	-	14
		<i>AA</i>	1	1	-	-	-	3(3)*	1(1)*	5
		Total	15	12	1	26	7	4	2	39

*Números entre parênteses indicam o número de animais portadores do Alelo *E^D* do gene *MC1R*

3.2. Discussão

A expressão da cor da pelagem em ovelhas é afetada diretamente pela distribuição e atividade dos melanócitos, mas também pelas interações genéticas entre os alelos candidatos. Para que um ovino manifeste pigmentação de cores escuras é necessária a presença de homozigose do alelo recessivo não-agouti (A^a) no locus *ASIP* ou também pode ocorrer devido ao alelo preto dominante (E^D) que está situado no locus extensão do gene *MC1R*. Em ambos os casos, a pigmentação escura expressa na lã não é distinguível fenotipicamente (Searle, 1968, Sponenberg, 1997). Neste estudo constatamos a presença de ambas as maneiras de expressão da coloração escura (não branca) no rebanho de conservação da raça Crioula.

Neste estudo constatamos que a associação existente entre o fenótipo (colorido) não branco com o alelo E^D dominante em ovelhas Crioula está em conformidade com os efeitos causados pelas mutações no receptor do gene *MC1R*. Esta associação foi descrita em outras raças ovinas em que existia a presença do alelo E^+ que corresponde ao homozigoto recessivo para o fenótipo branco (Vage *et al.*, 1999, Vage *et al.*, 2003, Royo *et al.*, 2008, Calvo *et al.* 2006, Deng *et al.*, 2009, Fontanesi *et al.*, 2010 e Fontanesi *et al.*, 2011).

Animais portadores do alelo E^D , em sua maioria apresentaram cores escuras, houve uma exceção, um indivíduo de coloração branco mascarado portador do genótipo $E^D E^+$ heterozigoto, este ovino não possuiu as mutações que causam o alelo preto recessivo não-agouti que são a deleção *D5* e a mutação (A) na posição T5172>A do exon 4 mas possui a duplicação do gene *ASIP* que está prevista para causar coloração branco dominante.

Na ovelha Crioula os fenótipos de cores claras, como o branco e branco mascarado foram totalmente associados com o genótipo selvagem ($E^+ E^+$) e ao alelo duplicado (A^D) (Norris & Whan, 2008) Estas mutações estão de acordo com a encontrada na raça Merino, onde todos os animais de fenótipos claros são homozigotos e possuem pelo menos uma cópia do alelo duplicado. Este modelo também foi observado nas raças ovinas: Texel, Appenninica, Bergamácia e Sarda (Fontanesi *et al.*, 2011).

Observamos no rebanho de conservação da ovelha Crioula que a diversidade dos eventos de deleção de 5 e 9pb no exon 2 juntamente com o SNP não sinônimo situado no exon 4, T5172, deram origem a cinco diferentes genótipos referente à deleção no exon 2 do gene *ASIP* (*NN*, *D5N*, *D9N*, *D5D5* e *D5D9N*). Embora a diversidade de coloração e tons da lã

da Crioula seja evidente, não houve associação entre, as variações na região codificadora do gene *ASIP* e as diversas colorações da pelagem da Crioula. A maioria dos genótipos existentes no rebanho de conservação da Crioula puderam ser explicados pelo modelo de herança da coloração estabelecido pela interação epistática entre os genes *ASIP* e *MC1R*. Porém, do total de 115 animais, sete não puderam ser explicados. Os sete animais citados (1 de coloração clara e 6 coloridos) apresentaram pelo menos uma cópia do Haplótipo H2 do gene *MC1R* (mais frequente) de forma que não aparenta que esses desvios tenham relação com algum polimorfismo adicional do gene *MC1R*. O mesmo é verdade para o gene *TYRP1* onde não se observou presença de nenhum haplótipo específico nesses animais.

Os seis ovinos coloridos (possuem genótipos de animal branco e fenótipo de cor escura) não possuem as deleções do exon 2 (*NN*) e nem a duplicação do gene *ASIP* (com exceção de um animal preto que possui a duplicação) Todos os seis ovinos coloridos possuem o SNP funcional (A5172>T) e o genótipo recessivo (E^+E^+).

Após analisar os registros genealogicos dos seis ovinos coloridos que não se enquadram no modelo de herança atual, percebemos que quatro destes animais possuíam o mesmo progenitor, um ovino preto que também carrega o alelo da duplicação e que não possui as deleções de 5 e 9 pb do exon 2, carrega o SNP funcional A5172>T situado no exon 4 do gene *ASIP*.

Os outros dois ovinos coloridos que não puderam ser explicados pelo modelo de epistasia também são proles geradas por um mesmo progenitor, de coloração mouro que assim como suas proles não possui o alelo duplicado do gene *ASIP* e nem as deleções de 5 e 9 pb do exon 2 e carrega o SNP funcional A5172>T. Sabendo que o genótipo funcional (NN 5172>T, E^+E^+) é responsável pela coloração branca e no entanto foi encontrado em animais com fenótipo colorido cremos que algum fator desencadeante da coloração escura das proles pode estar ligado aos progenitores.

Gratten, (2010), ao analisar a população livre de ovinos Soay constatou a existência de 2 ovinos com fenótipos divergentes, assim como ocorreu nas seis ovelhas Crioulas os ovinos apresentavam a sequência de codificação funcional ($N5-5172>T$) para produção de coloração branca, porém eram coloridos. Gratten propôs modelo de herança de homozigose, em que pelo menos uma das mutações que causam o fenótipo branco, seria o desencadeador do silenciamento do promotor do gene *ASIP*. Uma hipótese, seria a presença de cópias duplicadas do gene *ASIP*, porém não funcionais de forma que acarretaria na formação de fenótipos escuros e não claros. Contudo não descartamos a possibilidade de haverem outros polimorfismos e genes agindo na população em questão.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que a ampla diversidade da coloração da lã das ovelhas Crioula, do núcleo de conservação está sendo regulada pela influência e interação epistática existente entre os alelos dos genes *MC1R* e *ASIP*. Apesar da possibilidade de outros genes não abordados neste estudo estarem envolvidos na determinação da coloração da lã. Observamos que a maioria dos genótipos existentes no rebanho foram explicados pelo modelo de herança da coloração estabelecido pela interação entre os genes *MC1R* e *ASIP*.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos através deste estudo poderão ser adaptados e incorporados na rotina de manejo do Núcleo de Conservação da raça ovina Crioula de forma a se manter e fornecer animais de acordo com a demanda dos produtores. Adicionalmente, gametas dos principais genótipos para pelagem deverão ser inseridos no banco de germoplasma da Embrapa Recursos Genético Biotecnologia (Cenargen) de forma a conservar parte da diversidade genética da raça.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCO. **Associação Brasileira de Criadores de Ovinos**. Disponível em: <http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/racas_links/crioula.htm>. Acesso em: 20 junho.2013.
- BARSH, G., GUNN, T., HE, L. SCHLOSSMAN, S. DUKE-COHAN, J. Biochemical and genetic studies of pigment-type switching. **Pigment Cell Research**, v.13, p.48–53, 2000.
- BENNETT DC AND LAMOREUX ML. The color *loci* of mice-a genetic century. **Pigment Cell Res.** 16: 333-344. 2003.
- CHEN S Y, HUANG Y, ZHU Q, Sequence characterization of the MC1R gene in yak (*Poephagus grunniens*) breeds with different coat colors. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, doi: 10.1111/age.12191 .2014.
- DENG WD, SHU W, YANG SL, SHI XW AND MAO HM. Pigmentation in black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the Tyrosinase gene. *Mol Biol Rep* 35:379-385. 2008.
- DENG WD, SHU W, YANG SL, SHI XW, *et al.*. Pigmentation in black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the MC1R gene. **Mol. Biol. Rep.** 36: 431-436. 2009.
- EQUIPE ESTATCAMP. Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. URL<http://www.portalaction.com.br/>. 2014.
- EXCOFFIER, L. & H.E. L. LISCHER. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources.** 10: 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 evidences. **BMC Genet.** 10: 47. 2009.
- FONTANESI L, BERETTI F, RIGGIO V, DALL'OLIO S, *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 Rumin. Res.** 91: 200-207. 2010

- FONTANESI L, DALL'OLIO S, BERETTI F, PORTOLANO B AND 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* 5:8-17, 2011.
- FONTANESI L, TAZZOLI M, BERETTI F AND RUSSO V. Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anim. Genet.* **37**: 489-493. 2006.
- GIRARDOT M, MARTIN J, GUIBERT S, LEVEZIEL H, JULIEN R AND OULMOUDEN A Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res* 18:34-41, 2005.
- GONÇALVES GL, MOREIRA GR, FREITAS TR, HEPP D, *et al.* Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. *Anim. Genet.* **41**: 308-310, 2010.
- GRATTEN J, BERALDI D, LOWDER BV, MCRAE AF, VISSCHER PM, PEMBERTON JM AND SLATE J 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* **274**:619–26, 2007
- GRATTEN J, PILKINGTON JG, BROWN EA, BERALDI D, *et al.* The genetic basis of recessive self-colour pattern in a wild sheep population. *Heredity* **104**: 206-214, 2010.
- HAN JL, YANG M, YUE YJ, GUO TT, LIU JB, NIU CE, .Analysis of agouti signaling protein (ASIP) gene polymorphisms and association with coat color in Tibetan sheep (*Ovis aries*). *Genet Mol Res* **14**:1200–9, 2015.
- HEPP D, Gonçalves GL, Moreira GRP, Freitas TRO Martins CTDC, Weimer TA and Passos D.T. Identification of the e allele at the Extension locus (*MC1R*) in Brazilian Creole sheep and its role in wool color variation. *Genet Mol Res* 11:2997-3006, 2012
- 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* **158**: 779-785. 2001.
- KLUNGLAND H, VAGE DI, GOMEZ-RAYA L, ADALSTEINSSON S, *et al.* The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome* 6: 636-639. Cockett NE, Shay TL, Smit M (2001). Analysis of the sheep genome. *Physiol Genomics* 7:69–78,1995.
- MIAO Y, WU G, WANG L, LI D, TANG S, LIANG J, . The role of MC1R gene in buffalo coat color. *Science China Life Sciences*;53:267–72. 2010.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res* 16.3/1215. 1988.
- MORAES JCF, SOUZA CJH **Descrição da Cor da Pelagem em um Rebanho de Ovelhas Crioulas**. Documentos/Embrapa Pecuária Sul, Bagé, Brazil 114:1-30,,2011.

- MOREIRA, G.R.P., SILVA, M.C. La retomada de la crianza de ovejas criollas en el.Brasil. **La Propaganda Rural**, v.1557, p.92-95, 2004.
- MUNIZ, M. M. M. **Estudo de associação ampla do genoma para coloração de pelagem em ovinos da raça Morada Nova. Brasília:** Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 58 p. Dissertação de Mestrado, 2015
- NORRIS BJ AND WHAN VA . A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. **Genome Res.** 18:1282-1293,2008
- SEARLE AG. Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals. Logos Press, London. 1968.
- SPONENBERG DP **Genetics of Colour and Hair Texture. In: The Genetics of Sheep** (Piper L and Ruvinsky A, eds.). CAB International, New York, 51-86., 1997
- VAGE DI, KLUNGLAND H, LU D, CONE RD Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. **Mamm enome** 10: 39–43,1999
- VAZ CMSL (2000). **Morfologia e Aptidão da Ovelha Crioula Lanada.** EMBRAPA Pecuária Sul, Bagé.Moraes JCF, Souza CJH, Descrição da Cor da Pelagem em um Rebanho de Ovelhas Crioulas. Documentos/Embrapa Pecuária Sul, Bagé, Brazil 114:1-30, 2011