

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA**  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA**

**DE OVINOS CRIoulos LANADOS DO BRASIL**

**Silvia Tereza Ribeiro Castro**

Brasília

2008

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA**  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA**

**DE OVINOS CRIoulos LANADOS DO BRASIL**

**Tese apresentada à Universidade de Brasília, como parte do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, área de concentração: Genética.**

**Silvia Tereza Ribeiro Castro**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Silviene Fabiana de Oliveira**

**2008**

## SALMO 23

- 1 O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.
- 2 Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.
- 3 Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.
- 4 Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.
- 5 Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.
- 6 Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Salmo de Davi, Bíblia Sagrada, versão Almeida corrigida e revisada.

## **A oração de Habacuque**

Ainda que as figueiras não produzam frutos e as parreiras não dêem uvas; ainda que não haja azeitonas nas oliveiras nem trigo para colher; ainda que não haja mais ovelhas nos campos nem gado nos currais;

mesmo assim eu me alegrarei no SENHOR e louvarei a Deus, o meu Salvador.

O SENHOR Deus é a minha força. Ele torna o meu andar firme como de uma corsa e me leva para as montanhas, onde estarei seguro.

(Bíblia Sagrada, Antigo Testamento, Livro de Habacuque Capítulo 3 versículos 17, 18 e 19; Versão: Nova tradução na linguagem de hoje)

Dedico esta tese a todos os criadores de ovinos Crioulos Lanados que na luta incansável de muitos anos mantiveram este precioso recurso, especialmente, àqueles que colaboraram para a realização deste trabalho disponibilizando seus animais para coleta de sangue:

Agenor , Esmeralda/RS

Cisne Lima, Bom Jardim da Serra/SC

Clara Vaz, Bagé/RS

Diceu, Fortaleza dos Valos/ RS

Farina , Nova Prata e Lageado Grande/RS

Jair, Pinheiro Machado/RS

João Brasil, Lavras do Sul/RS

Kramer, Bom Jesus/SC

Nélio Gauzelli, São José dos Ausentes/RS

Orlando, Santana da Boa Vista/RS

Sinval, André da Rocha/RS

Vera, Campos Novos/SC

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que nos capacita para enfrentarmos com fé os desafios desta vida e nos sustenta com seu amor infinito;

Aos meus pais, **Alair e Antônio André**, que me ensinaram com zelo e carinho a enfrentar os desafios com persistência e humildade, confiando Naquele que é nosso sustento;

Ao meu esposo, **Dr. Carlos Castro**, por sua colaboração desde a primeira versão do projeto, 1991, pela tradução para o inglês e revisão do texto; por seu apoio, companheirismo e atenção ao Samuel, nosso filho;

Ao meu filho, **Samuel Ribeiro Castro**, pela compreensão, carinho e atenção comigo;

Aos meus irmãos e respectivos cunhados e cunhadas (com seus filhos): **Silvana e Hossein (Chadia e Caroline)**, **Aila e Antônio (Dimarco e Theodoro)**, **André e Rosangela**, **Filomena e Sebastião (Alexandre, Lívia e Rafaela)**, **Paulo Henrique e Yurika (Beatriz e Henrique)**, **Ana Cláudia e Marco Antônio (Guilherme)**, **Reinaldo e Aucilene (Raquel e Rafael)** pelo apoio e atenção sempre presente, pelos momentos de lazer e descontração;

À prof. **Dra. Silviene Fabiana de Oliveira** por aceitar orientar este trabalho, pela compreensão, paciência, apoio e confiança em momentos que não foi possível corresponder às expectativas; pela colaboração e empenho para a finalização desta;

Ao colega **Dr. Samuel Rezende Paiva** que colaborou desde o início com sugestões, esclarecimentos, bibliografia, pelo apoio técnico e logístico em momentos cruciais viabilizando a realização da parte laboratorial, pelas análises estatísticas, pelo espírito de equipe, profissionalismo e amizade demonstrados. Obrigada por sua valiosa contribuição;

À colega **Dra. Clara Marineli Silveira Luiz Vaz** pelo incentivo; compromisso profissional, por participar de todas as viagens de coleta e não medir esforços para contribuir, em vários momentos, especialmente, no contato com os criadores, pelo apoio através da Embrapa Pecuária Sul para a realização das viagens à campo, com a participação de funcionários e estagiários; pela motivação e disposição sempre presentes para a conservação dos ovinos crioulos lanados. Por sua contribuição, compartilhando conosco parte da realização de um sonho: a conservação dos recursos genéticos animais – ovino crioulo lanado, na Embrapa;

Ao **Dr. José Manoel Cabral de Souza Dias**, Chefe-Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela colaboração, especialmente, para a realização da última viagem de coleta, pela confiança e amizade;

A **Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia** e **Dr. Alexandre Caetano**, componentes da Banca de Qualificação, pelas sugestões. Meu agradecimento, ainda, à

Dra. Nazaré pelo apoio e colaboração técnica inicial, inclusive, indicando a orientadora; e ao colega Dr. Alexandre pela participação no sequenciamento das reações de PCR;

À **Dra. Dulce Rocha** pela colaboração e análises do capítulo 1;

Aos **componentes da banca examinadora** pelo aceite para avaliar este trabalho, pelas sugestões e contribuições;

Aos **criadores de ovino crioulo lanado** que colaboraram com seus animais para esta pesquisa;

Ao colega **Dr. Arthur da Silva Mariante**, conselheiro acadêmico e revisor do resumo em inglês;

À colega **Dra. Andréa Alves do Egito** por parte da revisão final e análise estatística, e pelas sugestões;

À colega **Dra. Maria do Socorro Maués Albuquerque** pela companhia e apoio na etapa final e ao colega **Dr. José Roberto de Alencar Moreira** pelo agradável convívio;

À colega **Dra. Sandra Santos**, da Embrapa Pantanal, pela colaboração na coleta dos animais do ecótipo Zebua;

À colega **Dra. Vânia Azevedo** pela colaboração no entendimento dos programas GeneScan e Genotyper, pelos momentos dispensados em esclarecimentos e ao colega **Dr. Juliano Pádua** pela atenção e esclarecimentos;

À doutoranda **Carla dos Anjos** pelas valiosas “dicas” laboratoriais e **Wellington Silva** pela atenção e presteza sempre presentes;

Ao doutorando **César Petroli** pela colaboração na instalação e esclarecimentos dos programas Genepop e Genotyper; pela atenção, amizade e companhia nas atividades de laboratório, especialmente na extensão dos dias em horário de verão, nos fins de semana e feriados;

Aos estagiários que participaram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa, auxiliando nas coletas à campo e atividades de laboratório: **Clarissa Vaz, Reinaldo Moura, Daniel Diniz, Fabrice Gotelipe, Cícero Abiorana, Natália Martins e Gabriel Barretto**;

Aos demais estagiários do Laboratório de Genética Animal: **Angela, Karen, Leonardo e Wanessa**, e do Laboratório de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília: **Ana Paula, Ana Luísa, Arthur, Eduardo, Flávia, Gabriel, Guilherme, Gustavo, Lane, Neida, Neide e Rejane** pelo agradável convívio; à **Gabriel Falcão** por várias colaborações, especialmente, à **Carolina Gontijo** e **Maria Emília** pela colaboração estatística em parte das análises;

À **Lígia Fortes** pela revisão bibliográfica e **Sérgio Noronha**, geoprocessamento;

À **Dra. Andréia Alvarenga**, seu esposo **Dr. Mário Grassi**; **Aila Ribeiro**; **Dr. Carlos Molina Loza**, **Dra. Mirna Flores**, **Dra. Silvana Karnib** e **Dra. Tereza Yamazuki** por sua dedicação profissional e atenção à minha saúde;

Aos amigos e conselheiros: **Sóstenes** e **Heronildes**; **Adail Sandoval**; **Iran** e **Neuza**; **Ruben** e **Shirley**; **Julieta Azevedo**, **Dra. Elza** e **Dra. Raquel**;

Aos **irmãos na fé** que estiveram orando por mim durante este período, especialmente, às irmãs do Ciclo de Oração da igreja evangélica Assembléia de Deus, 612 Sul Plano Piloto-Brasília.

Às **famílias Perez** (Ana Cristina e Miguel), **Vellasquez** (Marta e Fernando) e **Castro** (Oscar e Nice) pela atenção, amizade e pela companhia de seus filhos **Abner** e **Michele**; **Maurício** e **Lucas**; **Douglas**, **Matheus** e **Henrique** – respectivamente, ao meu filho Samuel;

À **Eliane Sousa Alves**, minha secretária do lar, pela boa convivência, responsabilidade e dedicação ao trabalho, apoiando-me nas atividades domésticas;

A **todos que colaboraram** para a realização de mais uma etapa, ovino Crioulo Lanado, viabilizando a da conservação de recursos genéticos animais na EMBRAPA;

À **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** através de suas Unidades de Pesquisa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Pecuária Sul, pelo apoio de seus funcionários, pelo suporte financeiro através dos projetos de pesquisa da equipe de Recursos Genéticos Animais e pela oportunidade de realizar esta pós-graduação e

À **Universidade de Brasília**, representada por professores e funcionários do Laboratório de Genética e Morfologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.



## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO GERAL

Origem da espécie ovina doméstica	1
Conceito de raça	1
Ovino Crioulo Lanado brasileiro: origem e características	2

### JUSTIFICATIVA

Por que caracterizar e conservar o ovino Crioulo Lanado brasileiro?	7
Marcadores genéticos	8

### OBJETIVO GERAL 10

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 11

### CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Rebanho de conservação	17
3.2 Amostragem, extração e quantificação de DNA	17
3.3 Condições laboratoriais para análise RAPD	18
3.4 Análise estatística	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

CAPÍTULO II	
1. INTRODUÇÃO	32
1.1 Marcadores genéticos do tipo microssatélites autossômicos	33
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Amostragem	37
3.2 Processamento das amostras, extração e quantificação de DNA	40
3.3 Marcadores microssatélites autossômicos	40
3.4 Condições da PCR	43
3.4 Eletroforese capilar e genotipagem	45
3.5 Análise estatística	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO III	
1. INTRODUÇÃO	74
2. OBJETIVOS	76
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Amostragem e análises laboratoriais	77
3.2 Análise estatística	77
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5. CONCLUSÕES	90
6.REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS	91

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
6. ANEXO 1	93

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figuras A, B, C e D.** Aspectos morfológicos do ovino crioulo lanado: A – Fronteira; B – Serrana; C – Zebua; D – Comum. 06

### CAPÍTULO I

- Figura 1.1.** Matriz com resultado do qui-quadrado ( $GL = 94$ ) para o teste exato de diferenciação populacional de Raymond & Rousset (1995) (abaixo) e o p-valor (acima). Grupos do rebanho de conservação: A, B, C, D, E, F e G. Maior e menor valor de qui-quadrado em negrito. 24

- Figura 1.2** Distância genética de Nei (1972) entre os sete grupos (A, B, C, D, E, F e G) de animais que compõem o rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul. 24

- Figura 1.3** Diagrama das duas primeiras coordenadas principais mostrando o relacionamento entre os sete grupos do rebanho de conservação. O grupo G representa o ecótipo Serrana e os demais (A, B, C, D, E e F) a raça Fronteira. 25

### CAPÍTULO II

- Figura 2.1** Distribuição geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletas de sangue dos ovinos crioulos lanados, de fora do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul. 39

- Figura 2.2** Árvore de relacionamento do tipo Neighbor net entre ovinos crioulos lanados e a raça *Corriedale*. 61

- Figura 2.3** Diagrama das duas primeiras coordenadas principais mostrando o relacionamento entre as duas populações de OCL raça Fronteira, as duas OCL ecótipo Serrana e a raça *Corriedale*. 62

### CAPÍTULO III

- Figura 3.1** Dendograma obtido a partir da distância genética de Nei (1972), com a análise de nove marcadores microssatélites autossômicos, mostrando a relação entre ovinos crioulos lanados brasileiros e a raça *Corriedale*. 87

- Figura 3.2** Diagrama das duas primeiras coordenadas principais mostrando o relacionamento entre os três ecótipos de OCL e raça *Corriedale*. A– Fronteira; B– Serrana; C– Zebua e D– *Corriedale*. 87

- Figura 3.3** Análise do Structure considerando  $K = 3$ . A– Fronteira; B– Fronteira Rebanho; C– Serrana Rebanho; D– Serrana; E– *Corriedale*; F– Zebua. 89

**Figura 3.4** Análise do Structure considerando K = 4. A– Fronteira; B– Fronteira Rebanho; C– Serrana Rebanho; D– Serrana; E– *Corriedale*; F– Zebua. 89

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.1:** Distribuição das frequências das bandas RAPD nos sete grupos do rebanho de conservação “*in situ*” do ovino Crioulo Lanado brasileiro, da Embrapa Pecuária Sul (o sinal “-” indica a ausência do alelo na amostra). 22

**Tabela 1.2:** Análise de variância molecular (AMOVA) para 224 animais amostrados entre os sete grupos do rebanho de conservação “*in situ*” da Embrapa Pecuária Sul. 23

### CAPÍTULO II

**Tabela 2.1.** Procedência dos animais dos ecótipos Fronteira e Serrana cujos materiais biológicos compuseram a amostra de animais de fora do rebanho de conservação de ovinos crioulos lanados da Embrapa Pecuária Sul; RS – Rio Grande do Sul e SC – Santa Catarina. 38

**Tabela 2.2:** Características dos marcadores do tipo microssatélites utilizados: localização cromossômica, seqüência dos iniciadores, marcação fluorescente, variação em pares de base (pb) dos alelos descritos e referências. 41

**Tabela 2.3:** Condições da reação em cadeia da polimerase (*PCR*) para os marcadores genéticos, do tipo microssatélites analisados. Para todos os marcadores foi utilizado solução com 2,5 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 unidade de Taq DNA polimerase por reação e 10% do volume total da reação de Tampão 10x (Tris/HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 0,1 mM pH 8,0); TP = temperatura de anelamento. Nas reações dos marcadores com \* foi acrescentado 1,6µl de BSA (2,5mg/µl). 44

**Tabela 2.4.** Protocolo de preparo dos produtos de amplificação para genotipagem em seqüenciador automático *ABI Prism 3100®* 45

**Tabela 2.5.** Frequências alélicas, número de alelos totais, tamanho amostral por marcador (N), heterozigose observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) por loco,  $p$ -valor do teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o  $PIC$  para 16 marcadores do tipo microssatélites em quatro populações de ovinos crioulos lanados: Fronteira, Fronteira do rebanho de conservação, Serrana, Serrana do rebanho de conservação e a raça *Corriedale*. Em negrito encontram-se os locos por população que não apresentaram aderência ao EHW e os valores de  $p < 0,003$  (alfa, após a correção de Bonferroni). 52

**Tabela 2.6.** Valores de  $F_{IS}$  e  $p$ -valor para os 16 marcadores do tipo microssatélites, nas cinco populações analisadas. 59

**Tabela 2.7.** Porcentagem de diferença entre as populações analisadas e o  $p$ -valor, estimados pela AMOVA (Analysis of Molecular Variance): na diagonal de baixo encontram-se os valores de  $F_{ST}$  e na de cima os  $p$ -valores. Os valores em negrito indicam a maior e a menor diferença genética entre pares de populações. 60

**Tabela 2.8** Variação genética em diferentes níveis, entre e dentro de populações de ovinos crioulos lanados e a raça *Corriedale*. Análise de variância molecular (AMOVA) e valores de  $F_{ST}$  que correspondem a variância entre as populações;  $p < 0,001$ . 61

### CAPÍTULO III

**Tabela 3.1** Frequências alélicas, número de alelos (máximo e médio), tamanho amostral por marcador ( $N$ ) e médio, heterozigose observada por loco ( $H_o$ ) e média ( $H_o$  média) e esperada por loco ( $H_e$ ) e média ( $H_e$  média), valor de  $p$  para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) com relação a nove marcadores do tipo microssatélites autossômicos em ovinos crioulos lanados e na raça *Corriedale*. 81

**Tabela 3.2** Alelos compartilhados, por loco, entre ovinos crioulos lanados e a raça *Corriedale*. OCLF (ovino crioulo lanado Fronteira), OCLS (ovino crioulo lanado Serrana), OZ (ovino crioulo lanado Zebua) e OC (ovino *Corriedale*). 86

**Tabela 3.3** Valores de  $F_{IS}$  por marcador genético e respectivo  $p$  valor para as populações de ovinos crioulos lanados e da raça *Corriedale*. Menor e maior valor de  $F_{IS}$  em negrito. 86

## RESUMO

O conhecimento da variabilidade genética existente em raças locais de animais zootécnicos é importante para a conservação do patrimônio genético e para programas de melhoramento animal. O objetivo geral deste trabalho foi analisar a diversidade e a variabilidade genética do ovino Crioulo Lanado brasileiro por meio de marcadores genéticos do tipo RAPD e SSRs. As amostras analisadas representaram o rebanho de conservação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, bem como as populações de ovinos crioulos existentes na área de ocorrência. Os resultados indicaram que a variabilidade genética total da raça Fronteira e do ecótipo Serrana não está representada no rebanho de conservação da EMBRAPA nem nos demais rebanhos amostrados. Os animais mantidos pela EMBRAPA apresentaram mais introgressão de *Corriedale* que os da população externa. Em todas as análises o ecótipo Zebua foi o mais dissimilar entre os crioulos.

## **ABSTRACT**

The knowledge of the existing genetic variability in local breeds of livestock is important for the conservation genetics and for programs of animal breeding. The general objective of this research was to analyze the diversity and the genetic variability of Brazilian Creole Wool Sheep raised in the Southeastern region of the country through the utilization of molecular markers (RAPD and STR). The analyzed samples represented the conservation nucleus belonging to Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA as well as others flocks present in the region. The results indicated that the total genetic variability of the Fronteira breed and the ecotype Serrana is not represented in the EMBRAPA's flock nor in the others sampled flocks. The animals kept by EMBRAPA presented a higher introgression of Corriedale than that of the external population. In all analyses the Zebua ecotype was the most dissimilar among the Creoles.



## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Origem da espécie ovina doméstica

O gênero *Ovis* agrupa várias espécies, incluindo aquelas não domesticadas como o muflón (*Ovis musimom*), o urial (*Ovis vignei bochariense*) e o argali (*Ovis ammon nigrimontana*, *O. a. collium*). Variedades do muflón são encontradas atualmente nas ilhas de Córsega, Sardenha e na Ásia (musimom oriental). O urial está difundido desde o Mar Cáspio até o Himalaia e o argali encontra-se nas regiões montanhosas da Ásia Central (Muñoz, 2003). Os ovinos domésticos pertencem à espécie *Ovis aries* que está distribuída em rebanhos por todo o mundo, sendo que a maior concentração destes é encontrada em regiões geográficas com extremos de temperatura (Siqueira, 2001).

A origem e a relação filogenética dos ovinos domésticos foi investigada a partir do DNA mitocondrial – mtDNA, incluindo cinco raças da Europa, quatro da Ásia, uma da África e alguns muflón, urial e argali. A comparação das seqüências do mtDNA mostrou que ovinos domésticos europeus e asiáticos são diferentes. Os dados corroboram a hipótese que parte dos ovinos domésticos modernos e o muflón europeu têm ancestral comum, e evidenciou um ancestral silvestre adicional não pertencente ao argali nem ao urial, ainda não identificado (Hiendleder *et al.*, 1998).

De acordo com evidências arqueológicas, a domesticação dos ovinos iniciou no período Neolítico, há 10.000 anos, na região do Crescente Fértil no sudeste da Ásia (Ryder & Stephenson, 1968). Conjuntos de animais diferenciados surgiram ao longo do tempo em consequência de efeitos do meio ambiente (clima, solo, altitude, relevo, tipo de pasto, entre outros), do sistema de manejo adotado e, sobretudo, pela seleção de caracteres de interesse zootécnico (Guo *et al.*, 2005). Conjuntos de animais de fazenda com características morfológicas definidas para produção de carne, leite, couro, entre outros produtos são denominados, pelos criadores, e aceitos como raças.

### 2. Conceito de raça

O termo raça tem distintos significados nas diversas áreas do conhecimento, como a biologia, a zootecnia e a sociologia. Em decorrência disto, torna-se necessário fazer a distinção da utilização do termo.

Em biologia “raça” tem diversas conceituações. De acordo com Mayr (1977) raça é um grupo taxonômico, subdivisão de uma espécie que geralmente surge como consequência de isolamento geográfico. Ainda em biologia, é definido como um grupo reconhecidamente formado por todos de uma espécie monotípica ou parte de uma politípica que difere em características biológicas, mas não difere, ou difere pouco, em características morfológicas. Para Futuyma (1998), raça é, de fato, um termo mal definido e é utilizado para um conjunto de populações ocupando uma região particular que difere em uma ou mais características das populações de outras regiões, freqüentemente equivalente à subespécie. Raça pode ser ainda definida como uma população circunscrita, com acentuada diferenciação genética.

Na zootecnia, o conceito mais utilizado de raça refere-se ao conjunto de animais com características morfológicas comuns, agrupados em função da sua aptidão produtiva (lã, carne, leite ou pele), área geográfica de exploração e da situação sócio-econômica (Santiago, 1975). Portanto, refere-se aos animais domésticos que pela seleção e cruzamentos passam a ter similaridades, as quais são transmitidas uniformemente para sua descendência.

A *Food and Agriculture Organization-FAO* define raça como um grupo de gado com características externas definidas ou identificáveis, que se distinguem morfológicamente de outros grupos da mesma espécie; ou um grupo para o qual houve separação geográfica e/ou cultural de outros fenotipicamente similares, tendo sido aceita sua identidade separadamente. Dessa forma, as raças zootécnicas são produto da evolução e adaptação a pressões de seleção impostas pelo clima, parasitas endêmicos, doenças, alimentação e critérios impostos pelo homem (Mariante & Egito, 2002).

O termo ecótipo, citado no presente trabalho, é utilizado em zootecnia como uma subdivisão de raça, sinônimo de variedade – que é um termo mais utilizado para conjuntos vegetais. A expectativa é que ecótipos dêem origem a raças zootécnicas, desde que cruzamentos sejam evitados entre eles e que o padrão seja devidamente estabelecido pelos criadores.

### **3. Ovíno Crioulo Lanado brasileiro: origem e características**

No Brasil, os ovinos são divididos em dois grandes agrupamentos: os lanados e os deslanados. As criações de ovinos lanados estão, principalmente, concentradas no Sul do país enquanto que os deslanados, no Nordeste. Dentre os ovinos lanados

brasileiros estão os crioulos, que são animais descendentes daqueles introduzidos pelos colonizadores portugueses logo após o descobrimento (Mariante & Cavalcante, 2000).

A origem do Ovino Crioulo Lanado-OCL é controversa. Parece ter descendência na raça espanhola Churra ou na raça portuguesa Churra Bordaleira (Primo, 2000; Vaz, 1993). Estudos com polimorfismo sangüíneo indicaram proximidade com a raça espanhola Lacha (Primo, 2000). Para outros, os OCL são resultado de cruzamentos desordenados de raças oriundas de diferentes procedências (Costa, 1922).

Os OCL vieram da Península Ibérica, no século XVII, para o Estado do Rio Grande do Sul trazidos pelos jesuítas (Vaz *et al.*, 1999). Ao longo das gerações, ocorreu uma diferenciação fenotípica e adaptação às condições edafoclimáticas da região Sul do país. Estes animais passaram, então, a ser conhecidos como “crioulos”. A morfologia descrita por Burfening e Chavez (1996) para a raça *Criolla* encontrada no Peru é semelhante àquela descrita para o ovino crioulo lanado brasileiro – raça Fronteira.

A partir da análise do DNA mitocondrial – mtDNA foram observados cinco haplótipos compartilhados entre a raça Fronteira e a ovelha crioula do México, sugerindo a origem comum dos ovinos lanados da América Latina. Ainda nessa pesquisa, foi identificado um haplogrupo comum entre raças crioulas lanadas da América do Sul (Paiva (2005). Até o momento, não são conhecidos os haplótipos das raças ibéricas das quais descendem as raças crioulas latinas.

Com base na morfologia, os OCL foram agrupados em quatro ecótipos distintos: Fronteira, Serrana, Zebua e Comum (Vaz *et al.*, 1999). Dentre esses, Fronteira (Figura A) e Serrana (Figura B) são os mais difundidos, hoje, entre os criadores. O ecótipo Fronteira, como o nome sugere, predomina na região fronteira do Brasil com a Argentina e o Uruguai. Em geral, os animais são criados extensivamente, acasalam-se em épocas controladas e são criados especialmente para produção de carne e lã. Em 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento reconheceu oficialmente, pela Portaria nº 38 de 10 de janeiro de 2001, o ecótipo Fronteira como raça. O ecótipo Serrana predomina na região norte do Rio Grande do Sul e Planalto Catarinense. Os rebanhos são criados em regime semi-intensivo a intensivo, sem controle de acasalamento, e destinam-se à exploração de carne, lã e pelego.

O ecótipo Zebua (Figura C) e o Comum (Figura D) não são encontrados há, pelo menos, quatro décadas no Rio Grande do Sul (Vaz, comunicação pessoal). O

Zebua, conhecido, popularmente, como ovelha de Jacó, era encontrado principalmente no Estado do Paraná; tem porte maior que os outros tipos e apresenta orelhas grandes e caídas. A lã desse ecótipo tem mechas cônicas com dois tipos de fibras: uma mais curta e fina (chamada de lanilha) que fica sobre a pele, e outra mais longa observada como cobertura. Foi introduzida no Mato Grosso do Sul por migrantes que hoje a criam em pequenos rebanhos (Vaz, comunicação pessoal). A ovelha Comum, também denominada ovelha Pé-duro, de presépio ou da Bíblia, ficou conhecida no Rio Grande do Sul como Ovelha Ordinária, em função das características da sua lã. Comparativamente aos outros ecótipos, têm porte menor e algumas apresentam um apêndice submandibular. Sua lã, de coloração branca, é explorada para atividades artesanais. É raramente encontrada, menos que meia dúzia de animais foram localizados, alguns anos atrás, no Estado do Paraná (Vaz, comunicação pessoal).

Esses ovinos passaram por uma redução do efetivo populacional, principalmente em decorrência da substituição por raças especializadas na produção de carne e lã, e pelo cruzamento com outras raças. Apesar da possível extinção dos OCL, a Embrapa Pecuária Sul iniciou em 1983 sua conservação com o objetivo de:

- Conservar "*in e ex situ*" o ovino crioulo lanado e manter sua variabilidade genética;
- Incentivar a criação do ovino crioulo lanado, em propriedades particulares, procurando meios para promover a parceria, entre a Embrapa e os criadores, e
- Avaliar o potencial produtivo mediante a obtenção de parâmetros de desempenho fenotípicos e genéticos.

A conservação do patrimônio genético de raças adaptadas deu-se inicialmente em países desenvolvidos e se estabeleceu posteriormente em países em desenvolvimento, a exemplo do Brasil. A conservação dos recursos genéticos de animais de interesse zootécnico significa manejar o gado para uso humano, podendo produzir benefício sustentável para a geração de hoje e manter seu potencial para as necessidades e aspirações futuras (Bodó, 1989). Esse processo pode ser *in situ*, o qual consiste de animais vivos no ambiente natural ou *ex situ*, no qual o material genético é mantido criopreservado (Bodó, 1989).

Os objetivos da conservação de recursos genéticos animais são basicamente (Bodó, 1989):

- buscar oportunidades de alimentação para atender uma demanda de mercado atual e/ou futura;

buscar resguardar a segurança alimentar em função de mudanças que poderão ocorrer nos sistemas de produção vigentes;

utilizar os recursos genéticos como oportunidade de pesquisa;

utilizar os recursos genéticos com potencial sócio-econômico, e

valorar os recursos genéticos quanto aos aspectos histórico-cultural e ecológico.



**Figuras A, B, C e D.** Aspectos morfológicos do ovino crioulo lanado: A– Fronteira; B– Serrana; C– Zebua; D– Comum.

## JUSTIFICATIVA

### **Por que conservar e caracterizar o ovino Crioulo Lanado brasileiro ?**

A conservação de raças de interesse zootécnico em risco de extinção é indicada quando estas apresentam características sociais, produtivas e econômicas viáveis que justifiquem sua criação. No caso dos OCL, estes critérios são atendidos.

Os OCL têm despertado o interesse de criadores e pesquisadores por uma série de características que os destacam quando comparados com outras raças de ovinos. Dentre estas características, podem ser citadas a tolerância a verminoses (Bricarello *et al.*, 1997, 1999a, 1999b, 1999c) assim como a ectoparasitas, em especial carrapatos, segundo observações dos criadores. A prolificidade destes ovinos também chama a atenção. As fêmeas costumam ter duas gestações por ano e é comum darem duas crias em, pelo menos, um dos partos. Outras características observadas são habilidade materna, adaptabilidade – que inclui capacidade de sobrevivência em períodos de inverno rigoroso, facilidade de manejo e couro altamente resistente. Com relação aos produtos do OCL, embora não sejam ainda explorados industrialmente, mas em caráter artesanal, a lã apresenta cores variadas e maior comprimento do velo, o que tem despertado grande interesse na tecelagem para confecção de agasalhos, tapetes, mantas, entre outros, através da Cooperativa de Tecelãs, Bagé/RS. A carne também é consumida e comercializada localmente. A pele, analisada industrialmente, em escala experimental, tem sido classificada de qualidade superior à de outras raças quanto à maciez, elasticidade e resistência. A qualidade diferenciada para a pele é como napa vestuário.

A criação desses animais é relevante para a melhoria social e econômica de pequenas comunidades, envolvendo o resgate de culturas em extinção, como a tecelagem manual, em especial no Estado do Rio Grande do Sul. Nessas comunidades membros da família participam em diversas etapas do ciclo produtivo, desde a criação, manipulação do couro, bem como, no processamento e utilização da lã.

Porém, não é possível manejar e conservar apropriadamente o que não se conhece (Simianer & Meyer, 2003). Considerando que o OCL é um recurso genético e fonte de proteína animal, faz-se necessário conhecer a diversidade genética das populações ainda existentes no Brasil. Esse conhecimento é fundamental para auxiliar o desenvolvimento de estratégias apropriadas e eficientes destinadas à conservação de

animais representativos da raça, à coleta e criopreservação do germoplasma, bem como à utilização em programas de melhoramento genético.

Em decorrência de sua importância econômica e social para a região Sul do Brasil, a conservação e caracterização do OCL estão incluídas nos objetivos e metas do Plano Diretor da Embrapa Pecuária Sul (Bagé-RS). Por outro lado, a caracterização molecular dos recursos genéticos animais foi priorizada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, local onde a parte experimental da presente tese foi desenvolvida.

A fim de verificar se os ecótipos constituem grupos genéticos distintos e esclarecer a possível introgressão genética da raça *Corriedale* – raça comercial mais difundida entre os criadores de ovinos do Sul do país, fez-se necessário uma abordagem molecular por meio de marcadores genéticos. Pretendeu-se, ainda, avaliar a variabilidade genética do rebanho de conservação, o qual contempla apenas a raça Fronteira e o ecótipo Serrana, compará-lo com a população de crioulos externa e verificar a relação genética com o ecótipo Zebua, não incluído ainda no programa de conservação da EMBRAPA.

### **Marcadores genéticos**

Marcadores genéticos são regiões do genoma, locos, que podem apresentar variação tanto intra como inter específica. Antes do desenvolvimento da genética molecular os marcadores genéticos conhecidos eram produtos protéicos e/ou enzimáticos de regiões codificadoras e, portanto, uma subestimativa da diversidade. Com o desenvolvimento da genética molecular e, especialmente, com a introdução da técnica da reação em cadeia da polimerase – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) na década de 80 (Saiki *et al.*, 1985), foi possível o acesso a informações de todo o genoma. O método consiste na amplificação de seqüências específicas de DNA, as quais são definidas por seqüências curtas flanqueadoras à seqüência de interesse – denominadas iniciadores.

O desenvolvimento da técnica de RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (Williams *et al.*, 1990), também denominada AP-PCR (*Amplified Polymorphism - Polymerase Chain Reaction*), possibilitou a amplificação de fragmentos ao acaso no genoma. Essa técnica tem sido utilizada como uma primeira abordagem da variabilidade genética, incluindo raças naturalizadas brasileiras. Isto porque é uma análise rápida e



não depende do conhecimento prévio de regiões genômicas polimórficas na raça alvo ou em espécies próximas.

O desenvolvimento da biotecnologia tornou possível o seqüenciamento do genoma completo de diversas espécies e melhorou o acesso a regiões genômicas específicas e a avaliação da variabilidade genética. Nos últimos anos, os microssatélites autossômicos têm sido os marcadores genéticos mais utilizados para acessar a diversidade genética em diversas espécies (Ollivier & Foulley, 2005; Tapio *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2007a; Martinez *et al.*, 2007b; Martinez *et al.*, 2007c; Sun, 2007; Rongqing *et al.*, 2007; Rongqing *et al.*, 2007a; Megens *et al.*, 2008). Em pesquisas sobre a diversidade de espécies de interesse zootécnico os marcadores microssatélites foram utilizados em 90% dos casos (Baumung *et al.*, 2004).

## OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta pesquisa foi caracterizar a diversidade e estrutura genética do ovino Crioulo Lanado brasileiro visando responder aos seguintes questionamentos básicos:

1. Os animais mantidos no rebanho de conservação representam toda a variabilidade genética do ovino Crioulo Lanado brasileiro?
2. Há diferença genética significativa entre os ecótipos do OCL do Brasil?
3. Há introgressão da raça *Corriedale* na população de OCL?

Buscando responder a esses questionamentos, foram traçados como objetivos específicos:

- a. Avaliar a variabilidade genética do rebanho de conservação do OCL da EMBRAPA;
- b. Verificar a ocorrência de heterogeneidade genética entre os ovinos crioulos, representados no rebanho de conservação, com a raça *Corriedale*, e
- c. Propor, se for o caso, estratégias para a melhoria no manejo do rebanho de conservação.

A presente tese foi elaborada em três capítulos:

Capítulo 1: Caracterização genética do rebanho de conservação “*in situ*” do ovino crioulo lanado da Embrapa Pecuária Sul, avaliada por marcadores genéticos do tipo RAPD.

Capítulo 2: Avaliação da variabilidade genética do rebanho de conservação “*in situ*” do ovino crioulo lanado da Embrapa Pecuária Sul e introgressão genética da raça *Corriedale*, utilizando marcadores genéticos autossômicos do tipo microssatélites.

Capítulo 3: Divergências e similaridades genéticas entre o ovino crioulo lanado brasileiro – Fronteira, Serrana e Zebua – e a raça *Corriedale*.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BAUMUNG, R.; SIMIANER, H.; HOFFMANN, I. Genetic diversity studies in farm animals - a survey. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 121 (6): 361-74, 2004.

BODÓ, I. Methods and experiences with in situ preservation of farm animals. In: WIENER, G. (Ed.). **Animal Genetics resources: a global programme for sustainable development**. Rome, 1989. (FAO Animal Production and Health Paper, 80). Proceedings of the Expert Consultation on FAO Programmes for the Preservation of Animal Genetic Resources.

BURFENING, P. & CHAVEZ, C.J. The criollo sheep in Peru. **Animal Genetic Resources Information**, n.17, p.123-135, 1996.

COSTA, A. R. **O Rio Grande do Sul**. Ensino de Agronomia e Veterinária. 1 ed. Porto Alegre, Gráfica Livraria do Globo. Cap. 6 p.30, 1922.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary Biology**. Sunderland: Sinauer, 1998.

GUO, J.; DU, L. X.; MA, Y. H.; GUAN, W. J.; LI, H. B.; ZHAO, Q. J.; LI, X.; RAO, S. Q. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, v. 36, p. 331-336, 2005.

HIENDLEDER, S.; MAINZ, K.; PLANTE, Y.; LEWALSKI, H. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 113–120, 1998.

MARIANTE, A. DA S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

MARIANTE, A. S. & EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v.57, n.1, p. 223-235, 2002.

MARTÍNEZ, A. M.; QUIROZ, J.; DELGADO, J. V.; VEJA-PLA, J. L. Caracterización genética de la oveja canaria con microsatélites de ADN. **Achivos de Zootecnia**, v. 55, n. 216, p. 421-424, 2007a.

MARTÍNEZ, A. M.; QUIROZ, J.; MARQUES, J. R.; DELGADO, J. V. Estudio de la diversidad genética del cerdo negro canario con microsatélites de ADN. **Achivos de Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 425-428, 2007b.

MARTÍNEZ, A. M.; ROCHA, L.; QUIROZ, J.; DELGADO, J. V. Estudio de la diversidad genética intrarracial de la cabra murciano-granadina con microsatélites de ADN. **Achivos de Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 417-420, 2007c.

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo, SP: Editora Nacional; Universidade de São Paulo, 1977.

MEGENS, J-H.; CROOIJMANS, P. M. A. R.; CRISTOBAL, M. S.; HUI, X.; LI, N.; GROENEN, A. M. M. Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication. **Genetics Selection Evolution**, v. 40, p. 103-128, 2008.

MUÑOZ, C. E. Origen, formación y diferenciación de las razas ovinas. In: MUÑOZ, C.E. **Razas ganaderas españolas. II Ovinos**. [S.l.]: FEAGAS: MAPA, 470p., 2003.

OLLIVIER, L.; FOULLEY, J. L. Aggregate diversity: New approach combining within-and between-breed genetic diversity. **Livestock Production Science**, v. 95, p. 247-254, 2005.

PRIMO, A. T. The discovery of Brazil and the introduction of domestic animals. In: GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOURCE, 5., 2000, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

RONGQING, G.; CHANG, H.; WANG, L.; TSUNODA, K.; YANG, Z.; SUN, W.; JI, D.; LI, Y. Genetic differentiation of native sheep populations in East and South Asia. **Biochimical Genetics**, v. 2, p. 3421-32, 2007.

RONGQING, G.; CHANG, H.; WANG, L.; YANG, Z.; SUN, W.; JI, D.; LU, S.; DU, L. Gene flow among sheep breeds of Mongolian group in China. **Yi Chuan**, v. 29, n. 3, p. 324-8, 2007a.

RYDER, M. L. & STEPHENSON, S. **Wool growth**. Academic Press. London. 805p. 1968.

SANTIAGO, A. A. Os cruzamentos na Pecuária Bovina. Instituto de Zootecnia, São Paulo, 1975.

SIQUEIRA, E. R. Raças de ovinos. **Technology & Treinamento Agropecuário**, 19: 43, 2001

SUN, W.; CHANG, H.; JI, D.; XINJUN, L.; LEI, D.; LU, S.; TSUNODA, K. Analysis on genetic diversity and isolation mechanism by distance of different ecological type sheep breeds in Mongolia sheep group. **Journal Genetic Genomics**, v. 34, n. 11, p. 1001-9, 2007.

TAPIO, M.; TAPIO, I.; GRISLIS, Z.; HOLM, L-E.; JEPPSSON, S.; KANTANEN, J.; MICEIKIENE, I.; OLSAKER, I.; VIINALASS, H.; EYTHORSDDOTTIR, E. Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 3951-63, 2005.

VAZ, C. M. S. L. Situação atual da preservação e avaliação de ovinos Crioulos Lanados no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p. 207-215.

VAZ, C. M. S. L.; SELAIVE-VILLAROEL, A. B.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. S. Distribuição geográfica da ovelha crioula lanada no Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ESPECIALISTAS EN PEQUEÑOS RUMINANTES Y

CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS; ENCONTRO DE MEDICINA DE PEQUENOS RUMINANTES DO CONE SUL, 2.; JORNADAS URUGAIAS DE OVINOS, 11. , 1999, Montevideú. **Proceedings...** Montevideú: AVEPER, 1999.

## **CAPÍTULO I**

**Caracterização genética do rebanho de conservação “*in situ*” do ovino crioulo lanado da Embrapa Pecuária Sul, avaliada por marcadores genéticos do tipo RAPD**

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1983, a Embrapa Pecuária Sul iniciou o programa de conservação “*in situ*” do ovino Crioulo Lanado brasileiro (OCL). Essa iniciativa foi incentivada pelo rápido declínio do número de criadores desses animais, o que poderia ter culminado com a extinção dos mesmos, além do interesse da Embrapa em utilizar suas características em melhoramento genético. Para tanto, foi formado àquela época um rebanho de conservação com 36 animais do ecótipo Fronteira; posteriormente, em 1991, foram incluídos animais do ecótipo Serrana.

Até o momento não tinha sido avaliada a estrutura genética desse rebanho em termos de variabilidade e estruturação genética. Uma maneira relativamente simples e rápida de se realizar essa avaliação é com o uso da técnica de *Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD (Andersen e cols, 1991).

A técnica de RAPD foi utilizada para avaliar a distância genética entre as espécies bovina, bubalina, ovina e caprina (*Bos indicus*, *Bubalis bubalis*, *Ovis aries* e *Capra hircus*, respectivamente) (Appa Rao *et al.*, 1996), para verificar a estrutura genética de populações (Lynch & Milligan, 1994), caracterizar raças de bovinos (Rangel *et al.*, 2004), verificar diversidade genética entre raças de búfalos (Albuquerque *et al.*, 2000; Gwakisa, 2002), comparar raças de eqüinos (Apostolidis *et al.*, 2001), caracterizar populações de eqüinos (Fuck *et al.*, 2003), diferenciar subpopulações de caprinos (Oliveira, 2003) e subespécies de suínos (Gimenez *et al.*, 2003). Ainda, em animais de interesse econômico foi determinada a estrutura genética de raças caprinas nativas da Coreia (Chung *et al.*, 1998), a estrutura de populações em espécies de peixes no Brasil (Paiva, 2001) e a distância genética em abelhas de três países da América Latina (Oliveira *et al.*, 2004).

A relação genética entre raças nativas de ovinos da China com raças importadas, por meio de RAPD, mostrou que os dados estavam de acordo com a história das raças e sua localização (Yuanfang *et al.*, 2002). A técnica de RAPD também foi sensível para detectar diferenças genéticas entre raças nativas de ovinos do Egito e destas com raças comerciais (Ali, 2003); também, diferença entre raças ovinas da Tanzânia (Stephen *et al.*, 2000) e variação genética em bovinos e ovinos (Kantanen *et al.*, 1995).

No Brasil, foi usada para avaliar a variabilidade genética em raças naturalizadas de várias espécies, incluindo bovinos (Serrano, 2001; Spritze *et al.*, 2003), caprinos (Oliveira, 2003), búfalos (Silva *et al.*, 2003), eqüinos (Martins, 1996; Fuck *et al.*, 2003)

e ovinos (Silvério e cols, 2003; Paiva *et al.*, 2003; Paiva, 2005c). Foi utilizada, também, na caracterização genética da raça Santa Inês, o maior efetivo de ovinos deslanados do Brasil (Paiva *et al.*, 2005a). Poucos trabalhos utilizaram a técnica de RAPD para análise molecular da espécie ovina.



## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo geral:**

Avaliar, utilizando marcadores do tipo RAPD, a variabilidade genética do ovino crioulo lanado mantido no rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul, bem como verificar a existência de subestruturação nesse rebanho.

### **Objetivos específicos:**

1. Avaliar o perfil de bandas RAPD polimórficas utilizando 12 iniciadores aleatórios;
2. Estimar parâmetros de variabilidade genética por grupo de animais do rebanho: porcentagem de locos polimórficos e heterozigose esperada;
3. Avaliar a ocorrência de subestruturação genética no rebanho de conservação com base em:
  - a. AMOVA;
  - b. Teste exato para verificação de diferenciação populacional (Raymond & Rousset, 1995);
  - c. Distância genética (Nei, 1972);
  - d. Análise de coordenada principal (PCO).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Rebanho de conservação

O rebanho de conservação “*in situ*” de Ovinos Crioulos Lanados – OCL da Embrapa Pecuária Sul foi constituído a partir de 36 animais do ecótipo Fronteira que foram divididos em seis grupos, denominados: A, B, C, D, E e F, visando auxiliar o manejo reprodutivo. Foi introduzido, após oito anos de formação do rebanho, um sétimo grupo (G) do ecótipo Serrana. Desde a formação do rebanho, as matrizes e suas descendentes fêmeas foram mantidas em seus grupos originais, com rotação de reprodutores entre os grupos. Os reprodutores foram selecionados do próprio rebanho ou adquiridos de outras propriedades.

O critério para seleção dos reprodutores foi baseado no *pedigree*, padrão da raça e parâmetros reprodutivos, tais como, libido e qualidade espermática. Para as matrizes foi considerado, além do padrão racial e *performance* dos pais, o número de descendentes por ano e habilidade materna.

#### 3.2 Amostragem, extração e quantificação de DNA

Para a amostragem do rebanho, foram selecionados aleatoriamente de cada grupo A, B, C, D, E, F, e G o número respectivo de animais: 38, 38, 36, 33, 26, 30 e 23; totalizando 224. O material biológico para a obtenção do DNA foi o sangue total coletado por venopunção da jugular, em tubos *Vacutainer*® contendo EDTA a 10% como anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm/10 min para separação dos componentes sanguíneos e conservados a -20°C. O DNA genômico foi extraído dos leucócitos utilizando-se um protocolo inorgânico com alta concentração de sal (NaCl 3M) adaptado de Miller *et al.* (1988), conforme protocolo em anexo (Anexo 1). A concentração do DNA foi estimada pela comparação de padrões de DNA de fago  $\lambda$  (*lambda*) não digerido após eletroforese em gel de agarose a 1%, coloração com brometo de etídeo (0,6  $\mu\text{g/ml}$ ) e visualização sob luz ultravioleta. Foi realizada, também, a leitura em espectrofotômetro para verificar a pureza do DNA extraído. O DNA obtido foi dividido em duas amostras armazenadas a -80°C, uma de trabalho e outra para o Banco de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF.

### 3.3 Condições laboratoriais para análise do RAPD

Para a análise do RAPD foram utilizados 12 iniciadores compostos por 10 bases de nucleotídeos de seqüência arbitrária da *Operon Technologies* (Alameda, CA, USA): OPA 08, 09, 11, 12 e 17; OPB 05, 09, 12 e 13; OPE12 e 17 e OPK1. As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 13 µl, assim compostos: 20mM Tris-HCl (pH8,4), 50mM KCl, 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada dNTP, 8% BSA 2,5mg/ml, 0,4µM de iniciador, 1,5U Taq DNA polimerase (Gibco BRL) e 9ng de DNA. O programa de amplificação utilizado foi: 40 ciclos de 15 min 94°C, 1 min 35°C e 1 min 72°C, seguidos de 7 minutos a 72°C, com os termocicladores PTC-100 (MJResearch) e *Primus* (MWG-Biotech). A visualização e leitura foram realizadas após eletroforese horizontal dos fragmentos da PCR em gel de agarose 1,5% e coloração com brometo de etídeo. Para confirmar a repetibilidade das bandas polimórficas, as reações foram repetidas com cada iniciador e os resultados gerados para cada grupo foram resultado da mesma PCR e corrida eletroforética.

### 3.4 Análise Estatística

Para as análises estatísticas, os grupos nos quais estão divididos os animais do rebanho de conservação foram considerados populações.

Cada banda RAPD foi considerada com um loco dominante, sendo que a ocorrência de polimorfismos foi avaliada pela presença (1) ou ausência (0) da banda. A diversidade intra-grupo foi estimada, considerando que os grupos estivessem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, pela proporção de locos polimórficos e pela porcentagem de bandas exclusivas.

Os dados das bandas RAPD foram usados para calcular a variância, diferenciação e a distância genética entre os grupos. Para avaliar a diferenciação populacional foi utilizada a análise da variância molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 2000) e o teste exato de diferenciação populacional, de acordo com o proposto por Raymond & Rousset (1995), utilizando 1000 passos de desmemorização. A distância genética foi estimada pelo método de Nei (1972). Essas análises foram realizadas utilizando-se o programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Para a visualização gráfica do relacionamento genético entre os grupos foi utilizada a análise de coordenada principal (PCO) com os dados da matriz de distância genética de Nei (1972). A análise de PCO foi realizada com o programa NTSYS

(*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versão 2.0 (Rohlf, 1998).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos 12 iniciadores RAPD possibilitou a identificação de 47 bandas polimórficas (Tabela 1.1). Das bandas observadas, apenas uma (banda 3) ocorreu em todos os grupos de Fronteira e não foi encontrada na Serrana. É provável que esta seja uma banda diagnóstica, a qual poderá permitir a diferenciação da raça Fronteira com o ecótipo Serrana; sendo necessário, para confirmação, a avaliação com um número maior de marcadores.

A porcentagem de locos polimórficos (Tabela 1.1) foi estimada em mais de 80% para todos os grupos, exceto para o G composto por ovinos Serrana (74,5% dos locos polimórficos). Esses valores foram menores que os observados para raças de ovinos deslanados brasileiros cujos valores observados estiveram entre 87,0 e 96,3% (Paiva, 2005). No presente trabalho foi avaliada a variabilidade genética dentro de um rebanho com animais da raça Fronteira e do ecótipo Serrana, enquanto Paiva (2005) avaliou a variabilidade entre raças distintas. A técnica de RAPD detectou diferença entre populações de cavalos Pantaneiro (Fuck, 2003), subpopulações de caprinos da raça Moxotó (Oliveira, 2003) e subespécies de suínos, inclusive seus híbridos (Gimenez *et al.*, 2003).

Com relação à heterozigose esperada, os valores foram similares entre os grupos e variaram de 0,27 a 0,36 (Tabela 1.1). O menor valor foi encontrado no grupo G constituído por animais do ecótipo Serrana e o maior no grupo C, constituído por animais da raça Fronteira.

A análise de variância molecular (AMOVA, Tabela 2.2) evidenciou que há diferença significativa entre os grupos estudados ( $F_{ST} = 0,2242$ ;  $p < 0,001$ ). Esse valor de  $F_{ST}$  (diferença entre os grupos) é muito alto, em especial quando se considera que são grupos que compõem o mesmo rebanho. Em raças ovinas da Finlândia foram encontrados baixos níveis de variabilidade genética, utilizando RAPD (Kantanen *et al.*, 1995). A comparação entre raças de ovinos comerciais e naturalizadas brasileiras mostrou que 14,92% da variação genética total foi devido à diferença entre raças (Paiva *et al.*, 2005c). Esse valor é bem menor do que o observado entre grupos de animais de um mesmo rebanho.

Os resultados indicam que os grupos que compõem o rebanho de conservação, embora relacionados entre si, são distintos. A variabilidade significativa observada entre

os grupos (22,42%) sugere que a divisão em grupos de animais e o manejo têm favorecido a subestruturação do rebanho. Mesmo com a introdução eventual de fêmeas e de reprodutores de fora, a diferenciação entre os grupos tem sido mantida. É provável que a alta variabilidade observada entre os grupos tenha sido devido, principalmente, a um efeito do fundador, considerando que o rebanho foi formado apenas a partir de 36 animais.

O teste exato de diferenciação populacional de Raymond & Rosset (1995) revelou que todos os grupos do rebanho de conservação apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles. O menor valor de qui-quadrado foi observado entre os grupos A–G e o menor entre E-F (Figura 1.1). Este resultado foi corroborado pelas estimativas de distância genética de Nei (1972). A maior distância foi observada entre os grupos A–G, e as menores entre A–B seguidos por C–D (Figura 1.2). Por outro lado, a análise de coordenada principal demonstrou, visualmente, que não há formação evidente de agrupamento (Figura 1.3).

As diferenças genéticas observadas sugerem que esse padrão pode ser reflexo, principalmente, de um efeito do fundador. Mesmo com a introdução eventual de reprodutores e matrizes e o rodízio de reprodutores entre os grupos, a diferenciação se mantém, evidenciando que a variabilidade genética observada foi reflexo de uma diferenciação genética original entre as fêmeas do rebanho.

**Tabela 1.1** Distribuição das frequências das bandas RAPD nos sete grupos do rebanho de conservação “*in situ*” do ovino Crioulo Lanado brasileiro da Embrapa Pecuária Sul (o sinal “-” indica a ausência do alelo na amostra).

Bandas RAPD	Grupos do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul						
	A	B	C	D	E	F	G
1	0,95	0,87	0,86	0,94	0,92	0,97	0,96
2	0,66	0,03	0,24	0,48	0,35	0,13	0,04
3	0,61	0,34	0,46	0,24	0,70	0,53	-
4	0,68	0,84	0,73	0,78	0,58	0,77	0,70
5	0,37	0,16	0,54	0,48	0,35	0,73	0,61
6	0,29	0,34	0,46	0,15	0,27	0,33	0,09
7	0,90	0,63	0,67	1,00	1,00	0,09	0,83
8	0,55	0,42	0,43	0,42	0,58	0,09	0,48
9	0,76	0,61	0,59	1,00	1,00	0,97	0,22
10	0,26	0,26	0,16	0,70	0,54	0,06	0,70
11	0,87	0,90	0,86	0,97	0,85	0,87	0,87
12	0,97	0,92	0,73	0,91	0,88	1,00	0,78
13	0,26	0,13	0,46	0,27	0,42	0,20	0,13
14	0,84	0,84	0,81	0,94	0,85	1,00	0,65
15	0,74	0,63	0,67	0,61	0,65	0,77	0,96
16	0,71	0,68	0,81	0,82	0,85	0,93	0,61
17	0,66	0,26	0,67	0,48	0,73	0,40	0,65
18	0,34	0,55	0,95	1,00	0,85	0,60	1,00
19	-	-	0,16	0,12	0,23	0,07	0,48
20	0,53	0,69	0,59	0,57	0,46	0,57	0,52
21	0,95	0,97	1,00	0,94	0,96	0,97	1,00
22	0,71	0,74	0,73	0,79	0,77	0,40	0,30
23	0,40	0,60	0,59	0,70	0,61	0,63	0,39
24	0,34	0,31	0,49	0,45	0,65	0,57	0,22
25	0,31	0,18	0,46	0,54	0,38	0,17	0,52
26	0,24	0,24	0,49	0,57	0,27	0,17	0,30
27	0,87	0,66	0,78	0,76	0,42	0,90	0,48
28	0,76	0,60	0,92	0,88	0,58	0,80	0,13
29	0,24	0,29	0,32	0,42	0,54	0,47	0,56
30	0,95	0,74	0,46	0,94	0,65	0,70	0,56
31	0,60	0,5	0,54	0,21	0,77	0,60	0,91
32	0,92	0,95	0,70	0,09	0,08	0,40	0,52

Bandas RAPD	Grupos do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul						
	A	B	C	D	E	F	G
33	0,90	0,74	0,73	0,79	0,92	0,90	0,65
34	0,92	0,16	0,70	0,54	0,69	0,67	0,43
35	0,58	0,24	-	-	-	-	-
36	0,68	-	0,40	-	0,04	0,60	0,30
37	0,39	0,24	0,16	0,15	0,19	0,37	0,65
38	0,84	-	-	0,24	0,04	0,47	-
39	1,00	0,76	0,84	0,94	0,73	0,97	0,87
40	0,71	0,92	0,43	0,51	0,96	0,90	1,00
41	0,5	0,08	0,32	0,30	0,08	0,40	-
42	0,37	-	0,13	-	-	-	-
43	1,00	0,95	-	-	1,00	-	-
44	0,29	0,18	0,32	0,45	0,54	0,63	0,13
45	0,24	0,05	0,60	0,91	-	-	0,26
46	0,26	0,50	0,46	0,61	1,00	1,00	1,00
47	0,97	1,00	1,00	1,00	-	-	1,00
N (médio)	37,55	36,49	35,79	32,75	25,56	29,72	22,45
Locos polimórficos (%)	89,36	85,11	89,36	82,98	80,85	80,85	74,47
He	0,3546	0,2844	0,3614	0,3133	0,3064	0,3128	0,2715

**Tabela 1.2** Análise da variância molecular (AMOVA) para 224 animais amostrados entre os sete grupos do rebanho de conservação “*in situ*” da Embrapa Pecuária Sul.

Fonte de variação	GL*	SQ**	CV***	% total	P
<i>Entre os grupos</i>	6	383.832	1.80500	<b>22,42</b> Va	0,001
Dentro dos grupos	218	1361.825	6.24691	77,58 Vb	0,001

\*Graus de liberdade (GL);

\*\*Soma de quadrados (SQ);

\*\*\*Componentes de variância (CV).

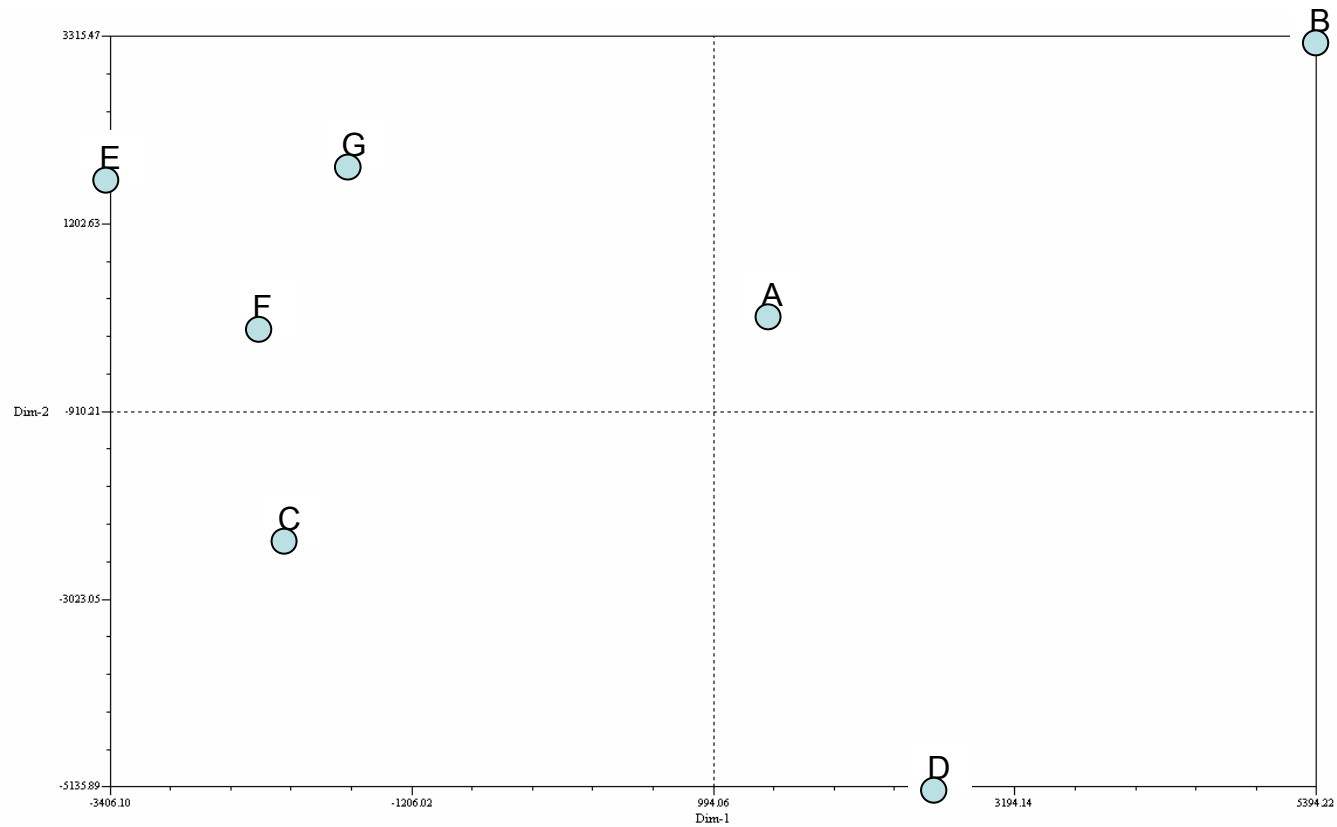


	A	B	C	D	E	F	G
A	***	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
B	252,15	***	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
C	257,71	302,76	***	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
D	338,06	332,44	224,95	***	0,0000	0,0000	0,0000
E	325,44	287,34	279,92	242,52	***	0,0000	0,0000
F	313,82	329,34	302,81	287,36	<b>215,48</b>	***	0,0000
G	<b>428,71</b>	343,14	287,20	330,88	262,58	323,89	***

**Figura 1.1** Matriz com resultado do qui-quadrado (GL = 94) para o teste exato de diferenciação populacional de Raymond & Rousset (1995) (abaixo) e o p-valor (acima). Grupos do rebanho de conservação: A, B, C, D, E, F e G. Maior e menor valor de qui-quadrado em negrito.

	A	B	C	D	E	F	G
A	*****						
B	<b>0,0668</b>	*****					
C	0,1114	0,0968	*****				
D	0,1476	0,1429	<b>0,0644</b>	*****			
E	0,1593	0,1327	0,1638	0,1476	*****		
F	0,1596	0,1533	0,1296	0,1325	0,0889	*****	
G	<b>0,2042</b>	0,1364	0,1116	0,1421	0,1581	0,1481	*****

**Figura 1.2** Distância genética de Nei (1972) entre os sete grupos (A, B, C, D, E, F e G) de animais que compõem o rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul



**Figura 1.3** Diagrama das duas primeiras coordenadas principais mostrando o relacionamento entre os sete grupos do rebanho de conservação. O grupo G representa o ecótipo Serrana e os demais (A, B, C, D, E e F) a raça Fronteira.

## 5. CONCLUSÕES

Os dados apresentados evidenciaram que os grupos que formam o rebanho de conservação do ovino Crioulo Lanado da Embrapa Pecuária Sul são geneticamente diferentes. Essa diferença pode ser atribuída:

- ✓ a diferenciação genética entre as fêmeas que iniciaram o rebanho;
- ✓ a divisão dos animais em grupos, mantida ao longo de duas décadas e meia, tendo como consequência a subestruturação do rebanho de conservação e
- ✓ o manejo reprodutivo adotado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARQUES, J. R. F.; GASPAROTTO, C. R.; MARTINEZ, A. N.; EGITO, A. A. Preliminary evaluation of genetic distance among four buffalo populations conserved on Marajó Island (State of Pará-Brazil). In: GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOURCES, 5., 2000, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 1 CD-ROM. Editado por Arthur da Silva Mariante.

ALI, B. A. Genetics similarity among four breeds of sheep in Egypt detected by random amplified polymorphic DNA markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 7, p. 194-197, 2003.

ANDERSEN, W. R.; FAIRBANKS, D. J.; MAUGHAM, P. J. **RAPD analysis for Biological Resource Characterization: a laboratory manual**. Provo, Utah: Brigham Young University, 1991.

APPA RAO, K. B. C.; BHAT, K. V.; TOTEY, S. M. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Genetic Analysis: Biomolecular Engineering**, v. 13, p.135-138, 1996.

APOSTOLIDIS, A. P.; MAMUIRIS, Z.; KARKAVELIA, E.; ALIFAKIOTIS, T. Comparison of Greek breeds of horses using RAPD markers. **Journal of Animal Breeding Genetics** v. 118, p.47-56, 2001.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C. M. S. L.; GENNARI, S. M.; SEQUEIRA, T. C.; BORBA, M. F.; GONÇALVES E GONÇALVES, I.; ECHEVARRIA, F. A. M. Resistência de cordeiros das raças Corriedale e Crioula Lanada frente a infecção natural por *Haemonchus contortus*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador. **Anais...** Salvador, BA: CBPV, 1999a.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C.M.S.L; GENNARI, S.M; SEQUEIRA, T.C; BORBA, M.F; GONÇALVES E GONÇALVES, I; ECHEVARRIA, F.A.M. Resistência de cordeiros das raças Corriedale e Crioula Lanada frente a infecção primária artificial por *Haemonchus contortus*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador. **Anais...** Salvador, BA: CBPV, 1999b.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C. M. S. L.; NUNES, A.; VAZ, C. Respostas hematológicas, bioquímicas, parasitológicas e histológicas de cordeiros da raça crioula lanada frente a infecção natural por *Haemonchus contortus*. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2., Brasília. **Anais...** Brasília: CENARGEN, 1999c.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C.M.S.L; BORBA, M.F.S; ECHEVARRIA, F.A.M; PINHEIRO, A.C. Susceptibilidade das raças Corriedale e Crioula Lanada a infecção natural por helmintos gastrintestinais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9., Itapema. **Anais...** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 6, 1997.

CHUNG, E. R.; KIM, Y. S.; KIM, G. W.; CHOI, S. H.; HAN, S. K. Identification of breed specific DNA markers in Korean native goats using RAPD and RAPD-SSCP. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 8., Seoul. **Anais...** Seoul, Korea: Seoul National University, 1998.

FUCK, B.; A. A. EGITO; A. S. MARIANTE; C. MCMANUS; S. R. PAIVA; ALBUQUERQUE, S. M.; SANTOS S. A.; SILVA, J. A. Genetic characterization of Pantaneiro horse using RAPD markers. In: WORLD CONGRESS ON ANIMAL PRODUCTION, 9., 2003, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: [s.n.], 2003.

GIMENEZ, D. L.; MOTA, L. S. L. S.; CURI, R. A.; ROSA, G. J. M.; GIMENEZ, M. A.; LOPES, C. R.; LUCCA, E. J. Análise cromossômica e molecular do javali europeu *Sus scrofa scrofa* e do suíno doméstico *Sus scrofa domesticus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, S.P., v. 40, n. 2, p. 146-154, 2003.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-362, 1992.

GWAKISA P. S. **Genetic diversity in indigenous cattle for East Africa - using RAPDs**. 2002. Disponível em: < <http://agtr.ilri.cgiar.org/Casestudy/Gwakisa/genedive.htm> >. Acesso em: 15/01/2008.

KANTANEN, J.; VILKKI, J.; ELO, K.; MAKI-TANILA, A. Randomly amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting variation. **Animal Genetics**, v.26, p. 315-320, 1995.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99, 1994.

MARTINS, V. B. **Técnica de diagnóstico com marcadores RAPD para uso e preservação do germoplasma equino**. 86 f. 1996. (Tese Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple setting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v 16, p.1215, 1988.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, n. 6, p. 283-292, 1972.

OLIVEIRA, R. de C.; NUNES, F. M. F.; CAMPOS, A. P. S.; VASCONCELOS, S. M.; ROUBIK, D.; GOULART, L. R.; KERR, W. E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 181-186, 2004.

OLIVEIRA, R. R. **Caracterização genética de populações de caprinos da raça Moxotó usando marcadores moleculares**. 2003. (Tese Mestrado) - UFPE, Recife, PE.

PAIVA, S. R. **Influência de obstáculos naturais na divergência de populações de *Astyanax bimaculatus* na Bacia do Rio Doce-MG**. 55p. 2001. (Tese Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PAIVA, S. R. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**. 108p. 2005. (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PAIVA, S. R.; SILVÉRIO, V. C.; EGITO, A. A. do; PIMENTEL, C. M. M.; FARIA, D. A. de; MARIANTE, A. da S.; LEITE, G.; AZEVEDO, H. C.; VILLARREOL, A. S.; CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; DERGAM, J. A. Characterization of the Principal Breeds of Brazilian Hair Sheep Using RAPD-PCR Molecular Markers. In: WORLD CONGRESS ON ANIMAL PRODUCTION, 9., 2003, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: [s.n.], 2003.

PAIVA, S. R.; FARIA, D. A. de; SILVÉRIO, V. C.; MCMANUS, C. M.; OLIVEIRA, A. A. de; DERGAM, J. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; PEREIRA, M. S.; EGITO, A. A. do; AZEVEDO, H. C.; LÔBO, R. N. B.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. da S. Aplicação de marcadores moleculares na conservação e melhoramento de um rebanho da raça Santa Inês. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, GO: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005a.

PAIVA, S. R.; SILVÉRIO, V. CHAVES ; EGITO, A. A. do; PIMENTEL, C. M. M.; FARIA, D. A. de ; MARIANTE, A. da S.; CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; DERGAM, J. A. Genetic variability of the main Brazilian hair sheep breeds using RAPD-PCR markers and conservation implications. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 887-893, 2005c.

RAYMOND, M. L.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

ROHLF, M. **NTSYS-pc**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0. Albany, N.Y: Department of Ecology and Evolution. University of New York, 1998.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin, ver.2.000**: A software for population genetic data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.

SERRANO, G. M. S. **Uso de marcadores moleculares RAPD na caracterização genética das raças bovinas nativas brasileiras**. 2001. 87 p. (Tese Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SILVA, A. C. M.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A.; MARQUES, J. R. F.; PAIVA, S. R.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. S. Distância Genética Entre Populações de Búfalos pelo uso de RAPD In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** São Paulo, SP: USP, 2003. p.189.

SILVÉRIO, V. C.; PAIVA, S. R.; EGITO, A. A.; MACMANUS, C. M. M.; FARIA, D. A.; MARIANTE, A. S.; NASCIMENTO, N. V.; LEITE, G.; AZEVEDO, H. C.; VILLARREOL, A. S.; CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. S. .M.; DERGAM, J. Caracterização Molecular das Principais Raças de Ovinos Deslanados do Brasil a partir de Marcadores Moleculares RAPD-PCR In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** São Paulo, SP: USP, 2003.

SIMIANER, H.; MARTE, S. B.; GIBSON, J.; HANOTTE, O.; REGE, J. E. D. An approach to the optimal allocation of conservation funds to minimize loss of genetic diversity between livestock breeds. **Ecological Economics**, v. 45, p. 377-392, 2003.

SPRITZE, A.; EGITO, A. A.; MARIANTE A. da S.; MCMANUS, C. Genetic characterization of Criollo Lageano cattle using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1157-1164, 2003.

STEPHEN, J.; KIFARO, G. C.; WOLLNY, C. B. A.; GWAKISA, P. S. Genetic relationships among five ecotypes of sheep in the United Republic of Tanzania. 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y3970E/y3970e0c6.htm> . Acesso em: 15/01/2008.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKY, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YUANFANG, G.; XIANGLONG, L.; ZHENGZHU, L.; JINQUAN, L. Studies of random amplified polymorphic DNA (RAPD) of main indigenous sheep breeds in China. **Hereditas**, v. 24, p. 423-426, 2002.

## CAPÍTULO II

**Avaliação da variabilidade genética do rebanho de conservação “*in situ*” do ovino crioulo lanado da Embrapa Pecuária Sul e introgressão genética da raça *Corriedale*, utilizando marcadores genéticos autossômicos do tipo microssatélites**



## 1. INTRODUÇÃO

As raças naturalizadas constituem recurso genético de interesse para a pesquisa por estarem adaptadas a condições climáticas específicas. A conservação da variabilidade genética dessas raças é necessária para futuros programas de melhoramento quando, certamente, haverá mudanças na produção e ameaça de novas doenças. Por outro lado, as raças usadas no sistema pecuário atual, possivelmente, não responderão a todas as demandas de mercado futuro. Características únicas apresentadas por raças adaptadas podem garantir um alto grau de heterozigose e desequilíbrio de ligação, os quais são requeridos na detecção de associações/ligações entre marcadores genéticos polimórficos e características quantitativas e qualitativas (Oldenbroek, 1999).

Quando uma raça está em risco ou ameaçada de extinção, a melhor estratégia é a conservação *in vivo*, pois nessas condições os objetivos da conservação podem ser melhor alcançados. Por outro lado, o desenvolvimento da raça deve continuar e isto significa seleção para características econômicas dentro dos limites de uma população pequena. Entretanto, há riscos de endogamia e deriva, portanto deve ser dada atenção especial aos programas de acasalamento para populações pequenas (Oldenbroek, 1999).

Uma das prioridades da pesquisa com espécies zootécnicas em risco de extinção é a caracterização das populações e mensuração das diferenças entre e dentro delas (Fitzhugh & Strauss, 1992), sendo a diversidade genética dada pela variedade de raças e pela variação genética dentro de cada uma delas. No caso dos OCL, a perda de um dos ecótipos poderá levar a perda de variabilidade genética, caso um deles tenha um perfil genético distinto dos demais e, como consequência diminuir a diversidade genética da espécie.

O desenvolvimento de técnicas moleculares e a possibilidade de detecção de polimorfismos de DNA têm facilitado a descrição da variação genética. Estas informações podem ser usadas para calcular as semelhanças e diferenças entre animais dentro e entre raças, auxiliando a indicação de indivíduos para a conservação. Foi estimado que, em geral, 50% da variação genética total dentro de uma espécie é devida à variação entre raças (Oldenbroek, 1999). Em um programa de conservação é fundamental conhecer a variabilidade genética da população alvo. Para tanto, uma das ferramentas moleculares que está sendo mais utilizada são os marcadores genéticos do tipo microssatélites autossômicos.

Ao longo dos cinco séculos, desde sua introdução no Brasil, o ovino Crioulo Lanado (OCL) foi sendo paulatinamente substituído por outras raças, levando-o quase à extinção. Buscando conservar esse material genético e resguardá-lo de possível extinção, a Embrapa Pecuária Sul,

localizada em Bagé (RS), iniciou em 1983 a formação de um rebanho de conservação. Naquela ocasião, julgou-se que o OCL deveria representar um valioso recurso genético com potencial para programas de melhoramento. Atualmente, o rebanho de conservação está constituído de animais da raça Fronteira acrescido de um pequeno número do ecótipo Serrana.

O objetivo geral deste capítulo foi caracterizar a variabilidade genética presente em animais da raça Fronteira e no ecótipo Serrana, avaliar a constituição do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul e buscar contribuir com a indicação de animais que representem melhor a diversidade genética da raça e do ecótipo em questão. Desta forma, poderá ser possível a exclusão de animais similares (aparentados) ou com introgressão da raça *Corriedale* e introdução de animais com alelos não representados no rebanho; o que resultará em diminuição do efetivo com conseqüente redução de tempo, mão de obra e recursos financeiros gastos com a manutenção de animais desnecessários à conservação. Poder-se-á, ainda, sugerir cruzamentos preferenciais visando maximizar a variabilidade genética existente no rebanho de conservação. Visa-se, também, neste capítulo avaliar a introgressão genética da raça *Corriedale* na raça Fronteira e no ecótipo Serrana.

### **1.1 Marcadores genéticos do tipo microssatélites autossômicos**

Os microssatélites, também denominados Seqüências Simples Repetidas – SSRs ou STRs (*Short Tandem Repeats*), são marcadores genéticos caracterizados pela ocorrência de seqüências curtas com 1 a 6 pares de bases de nucleotídeos repetidas *in tandem*. Em genomas de eucariotos, essas seqüências são frequentes e, em geral, constituem locos genéticos altamente polimórficos. Em mamíferos, os elementos repetidos mais frequentemente encontrados são extensões de dinucleotídeos CA e TG (Hamada *et al.* 1982).

Os microssatélites têm sido úteis na compreensão das relações evolutivas, taxonômicas, demográficas, filogenéticas, filogeográficas e da diversidade genética de organismos, incluindo espécies de interesse zootécnico: bovina (MacHugh, 1997), asinina (Aranguren-Méndez *et al.*, 2001), ovina (Arranz *et al.*, 1998; Arranz *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2003; Ollivier & Foulley, 2005; Tapio *et al.*, 2005; Martinez e cols, 2007a; Rongqing e cols, 2007; Rongqing e cols, 2007a; Sun *et al.*, 2007), ovina e caprina (Sun *et al.*, 2004), caprina (Martinez e cols, 2007c) e suína (Martinez e cols, 2007b; Megens *et al.*, 2008).

Comparado com outros tipos de marcadores genéticos, os microssatélites são altamente informativos para estudos em genética de populações por serem de natureza co-dominante,

multialélica e por sua ampla distribuição no genoma. Os alelos são herdados de forma mendeliana e são, na sua maioria, de caráter neutro quanto à seleção. Com relação a questões técnicas, podem ser analisados pela amplificação de fragmentos via técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR, a partir de reduzidas quantidades de DNA. Estas características têm feito dos microssatélites os marcadores mais usados para a análise do genoma de diversas espécies, na construção de mapas genéticos (Bishop *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 1995; Maddox *et al.*, 2000), teste de paternidade (Vankan & Faddy, 1999; Arruga *et al.*, 2001; Paiva e cols, 2004b; Aibao & Dengjun, 2005; Gomez-Raya *et al.*, 2008) e estudos de genética de populações (Bruford & Wayne, 1993; Kantanen *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2003; Paiva *et al.*, 2004a; Egito *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Egito *et al.*, 2007; Megens *et al.*, 2008), por exemplo.

Essa classe de marcadores distingue-se das demais em decorrência de seu modelo evolutivo que é mais rápido do que outras regiões genômicas. De acordo com o modelo *stepwise mutation*, o padrão de mutação dos microssatélites envolve o ganho e/ou perda de uma unidade de repetição pelo escorregamento da polimerase durante a replicação, um mecanismo de mutação que é específico para seqüências repetidas *in tandem*. A alta taxa de mutação dessas regiões gera dificuldades para utilização destes em análises de genética de populações quando se visa esclarecer filogenia. Problemas com a PCR, como por exemplo, artefatos como bandas *stutter*, dificultam a automação da identificação dos alelos microssatélites. Apesar de um grande número de locos microssatélites no genoma da maioria dos eucariotos, a densidade de locos microssatélites informativos pode ser muito baixa para algumas aplicações de mapeamento (Toth *et al.*, 2000; Dieringer & Schlötterer, 2003).

Com relação a animais domésticos, os microssatélites têm sido utilizados em estudos da relação genética entre espécies (Kemp *et al.*, 1995, Gortari *et al.*, 1997, Sun *et al.*, 2004) e entre raças de uma mesma espécie (Arranz *et al.*, 1998, Arranz *et al.*, 2001, Muñoz, 2003; Jia *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005). A relação filogenética e diversidade genética de raças ovinas nativas de uma região do norte da China foram estabelecidas utilizando essa classe de marcadores, evidenciando polimorfismo e diversidade genética quando comparadas com raças melhoradas (Jia *et al.*, 2003). Ainda com SSRs, foi avaliada a relação genética entre raças de ovinos da Espanha (Arranz *et al.*, 1998), da Ásia (Lu e cols, 2005), do Brasil (Paiva *et al.*, 2005d) e da Itália (Bozzi *et al.*, 2006).

Por meio de marcadores microssatélites foi avaliada a estrutura genética de populações em raças de várias espécies de animais naturalizados brasileiros, incluindo: ovina (Paiva *et al.*, 2004a; Paiva *et al.*, 2004b; Paiva, 2005; Paiva *et al.*, 2005a; Paiva *et al.*, 2005b; Paiva *et al.*, 2005d); bubalina (Albuquerque, 2005; Albuquerque *et al.*, 2006a; Albuquerque *et al.*, 2006b); suína

(Sollero, 2006; Sollero *et al.*, 2006); eqüina (Silva, 2006; Silva *et al.*, 2006) e bovina (Egito, 2007; Egito *et al.*, 2007). Da mesma forma, foram avaliadas espécies nativas da Espanha: ovina (Zamorano *et al.*, 1998; Marmi *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007a), caprina (Avellanet *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007c), bovina (Cañón *et al.*, 2007) e suína (Martínez *et al.*, 2007b); além de bovinos crioulos do Uruguai (Postiglioni *et al.*, 2007) e ovinos da Sibéria (Cinkulov e cols, 2008), entre outros.

Foi demonstrado que, aproximadamente, 50% de iniciadores de bovinos também amplificam DNA de ovinos e caprinos (Kemp *et al.*, 1995), e ovinos e bovinos (De Gortari *et al.*, 1997). Isto sugere que é possível planejar, inclusive, um único conjunto de marcadores para a caracterização genética da distância entre espécies de um mesmo gênero (Vaiman *et al.*, 1994) e o mapa de ligação dentro dessas três importantes espécies de animais domésticos. A conservação dessas seqüências permite que possam ser compartilhadas entre espécies geneticamente relacionadas, mediante a utilização de iniciadores heterólogos (Moore *et al.*, 1991; Hetzel, 1993).

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo geral:**

Avaliar a variabilidade genética do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul, compará-lo com a população externa da raça Fronteira e do ecótipo Serrana, bem como com a raça *Corriedale*, por meio de marcadores do tipo SSRs.

### **Objetivos específicos:**

1. Descrever a distribuição das frequências alélicas relativas a 16 marcadores autossômicos do tipo microssatélites em ovinos crioulos lanados Fronteira (OCLFR) e Serrana (OCLSR), ambos do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul; e animais destes dois ecótipos coletados em fazendas na área de ocorrência (Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina); e uma amostragem da raça *Corriedale*.
2. Comparar as populações utilizando índices de diversidade genética como: alelos compartilhados e exclusivos, aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigose esperada e observada.
3. Verificar a similaridade genética entre as populações crioulas e destas com a raça *Corriedale*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

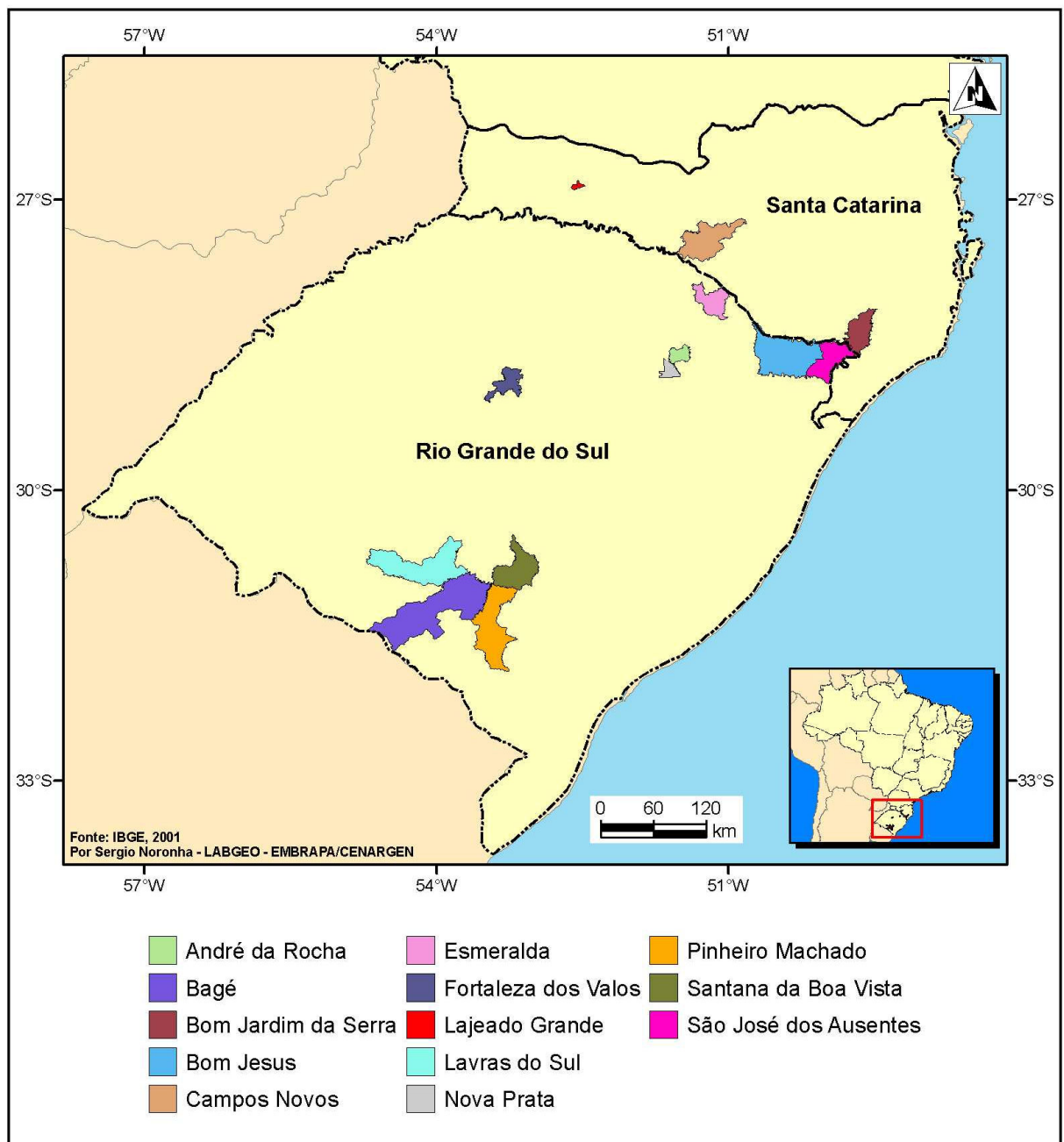
#### 3.1 Amostragem

Para a análise dos marcadores genéticos, foram coletadas amostras de sangue venoso, utilizando tubos de coleta a vácuo com EDTA a 10% como anticoagulante, em duas etapas. A primeira foi realizada em 2003, como já descrito no capítulo 1, e se deu na EMBRAPA Pecuária Sul, localizada na cidade de Bagé (RS), que mantêm um rebanho de conservação de OCL. Dentre as amostras coletadas de animais do rebanho, foram selecionadas 60 amostras para análise, sendo 55 do ecótipo Fronteira (OCLFR) e 05 do Serrana (OCLSR), seguindo o critério de ausência direta de parentesco. A segunda etapa, realizada em 2005, ocorreu em propriedades rurais particulares nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, onde foram coletadas amostras de sangue venoso de 47 animais do ecótipo Fronteira (OCLF) e 48 do Serrana (OCLS). Na Tabela 2.1 estão relacionados os municípios, estados e número de animais da raça Fronteira e do ecótipo Serrana cujos materiais biológicos compuseram a amostra de animais de fora do rebanho de conservação de ovinos crioulos lanados da Embrapa Pecuária Sul. Na Figura 2.1 está apresentada a distribuição geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletas.

Foram incluídos, ainda, 22 animais da raça *Corriedale* (OC), cujo material biológico foi acessado no Banco de DNA do Laboratório de Genética Animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. A escolha dessa raça comercial deveu-se ao fato da existência de relatos de cruzamentos com animais crioulos, buscando melhorar o desempenho zootécnico destes últimos. Buscou-se avaliar o grau de introgressão genética da raça *Corriedale* nos animais crioulos, tanto do rebanho de conservação quanto de fora dele.

**Tabela 2.1** Procedência dos animais dos ecótipos Fronteira e Serrana cujos materiais biológicos compuseram a amostra de animais de fora do rebanho de conservação de ovinos Crioulos Lanados da Embrapa Pecuária Sul; Rio Grande do Sul – RS e Santa Catarina –SC.

<b>Ovino Crioulo</b>	<b>Procedência</b>		<b>Número de indivíduos</b>
	<b>Município</b>	<b>Estado</b>	
Fronteira	Bagé	RS	14
	Pinheiro Machado	RS	02
	Santana da Boa Vista	RS	12
	Fortaleza dos Valos	RS	13
	Lavras do Sul	RS	11
Serrana	Nova Prata	RS	08
	São José dos Ausentes	RS	03
	Esmeralda	RS	01
	André da Rocha	RS	14
	Lajeado Grande	SC	03
	Bom Jardim da Serra	SC	10
	Campos Novos	SC	11
<b>Total</b>			<b>109</b>



**Figura 2.1** Distribuição geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletas de sangue dos ovinos crioulos lanados, de fora do rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul.



### 3.2 Processamento das amostras biológicas, extração e quantificação de DNA

As amostras de sangue venoso foram centrifugadas a 3.000 rpm/10 min para separação dos componentes sanguíneos: plasma, leucócitos e hemácias. Esse material foi colocado em três tubos independentes, etiquetados e conservados em freezer a -20°C.

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos utilizando-se um protocolo inorgânico com alta concentração de sal (NaCl 3M), adaptado de Miller *et al.*, (1988) (Anexo 1). A concentração do DNA foi estimada pela comparação de padrões de DNA de fago  $\lambda$ (*lambda*) após eletroforese em gel de agarose a 1%, coloração com brometo de etídeo (0,6  $\mu$ g/ml) e visualização sob luz ultravioleta. Para certificação da pureza da extração, a leitura das amostras foi realizada, também, em espectrofotômetro. A amostra foi dividida em duas alíquotas: uma de trabalho e outra para armazenamento no banco de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### 3.3 Marcadores microssatélites autossômicos

Foram testados 20 marcadores microssatélites – INRA23, OarFCB20, BM827, OarAE129, ILSTS87, ILSTS05, ILSTS11, INRA05, INRA35, INRA63, MAF65, MAF214, OarFCB48, SRCRSP05, OarFCB304, BM6526, OMHC1, OarCP20, OarHH35 e HUIJ 616. Na Tabela 3.2 estão apresentadas as características gerais dos marcadores analisados, assim como suas respectivas marcações fluorescentes utilizadas para detecção a *laser* em analisador automático de fragmentos modelo *ABI Prism 3100® Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

Os marcadores microssatélites utilizados para a espécie ovina foram recomendados pela FAO/ISAG- *Foundation Agriculture Organization/International Society of Animal Genetics* (Hoffmann *et al.*, 2004). Os locos INRA63 e ILSTS05 são recomendados, também, para avaliação de bovinos e caprinos; ILSTS05 para caprinos e bovinos e; SRCRSP05, ILSTS11, OarFCB20 e MAF65 para caprinos. Os locos INRA05, INRA23 e INRA35 foram recomendados, originalmente, somente para bovinos; o OarFCB48 e o ILSTS87 para caprinos; e o INRA23 para bovinos e caprinos. Os últimos locos citados foram utilizados em trabalhos anteriores de caracterização de ovinos (Paiva, 2005). Dentre os locos testados, o OMHC1, OarCP20, OarHH35 e HUIJ 616 ficaram fora das análises por não amplificarem bem com a maioria das amostras.

**Tabela 2.2:** Características dos marcadores do tipo microssatélites utilizados: localização cromossômica, sequência dos iniciadores, marcação fluorescente, variação em pares de base (pb) dos alelos descritos e referências.

<b>Marcador</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Seqüência dos iniciadores (5'-3')</b>	<b>Marcação fluorescente</b>	<b>Variação (pb)</b>	<b>Referência</b>
INRA23	1	GAGTAGAGCTACAAGATAACTTC TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	FAM	199 - 219	Vaiman <i>et al.</i> (1994)
OarFCB20	2	AAATGTGTTTAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC	TET	88 - 118	Buchanan <i>et al.</i> (1993a)
BM827	3	GGGCTGGTCGGTCGTATGCTGAG GTTGGACTTGCTGAAGTGACC	TET	211 - 225	Bishop <i>et al.</i> (1994)
OarAE129	5	AATTGCATTCAGTATCTTTAACATCTGGC GTAGATCAAGATATAGAATATTTTCAACACC	HEX	135 - 165	Penty <i>et al.</i> (1993)
ILSTS87	6	AGCAGACATGATGACTCAGC CTGCCTCTTTTCTTGAGAGC	FAM	143 - 169	Kemp <i>et al.</i> (1995)
ILSTS05	7	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	TET	181 -201	Brezinsky <i>et al.</i> (1993)
ILSTS11	9	GCTTGCTACATGGAACGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC	FAM	266 -288	Brezinsky <i>et al.</i> (1993b)
INRA05	10	CTTCAGGCATACCCTACACCACATG AAATATTAGCCAACCTGAAAACCTGGG	FAM	114 -152	Vaiman <i>et al.</i> (1994)
INRA35	12	ATCCTTTTGCAGCCTCCACATTG TTGTGCTTTATGACACTATCCG	FAM	116 - 138	De Gotari <i>et al.</i> (1997)
INRA63	14	ATTTGCACAAGCTAAATCGAACC AAACCACAGAAATGCTTGGAAAG	FAM	160 - 182	De Gotari <i>et al.</i> (1997)
MAF065	15	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	HEX	121 -139	Buchanan <i>et al.</i> (1991)
MAF214	16	AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGAC GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG	HEX	183 - 225	Buchnan & Crawford (1992)

<b>Marcador</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Seqüência dos iniciadores (5'-3')</b>	<b>Marcação fluorescente</b>	<b>Varição (pb)</b>	<b>Referência</b>
OarFCB48	17	GAGTTAGTAGTACACGGATGACAAGAGGCAAC GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	TET	133 - 169	Buchanan <i>et al.</i> (1993b)
SRCRSP5	18	GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	HEX	130 - 144	Maddox <i>et al.</i> (2000)
OarFCB304	19	CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	FAM	146 - 188	Buchnan & Crawford (1993)
BM6526	26	CATGCCAAACAATATCCAGC TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	TET	147 - 167	Bishop <i>et al.</i> (1994)

### 3.4 Condições da PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

A genotipagem dos locos microssatélites foi realizada pela avaliação do tamanho dos fragmentos específicos amplificados, utilizando a técnica de *PCR*. Para padronização das reações de amplificação foram utilizadas amostras de DNA de dois animais de cada ecótipo/raça e uma amostra testemunha (sem DNA). Condições otimizadas para a reação. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em um volume final de 20µl, utilizando-se dNTPs (2,5mM de cada dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP ), Taq (1 und/reação), 10% de tampão 10x (Tris/HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 0,1 mM pH 8,0) e os demais reagentes conforme descrito na Tabela 2.3.

Para definição das temperaturas de anelamento para cada iniciador, foi utilizado o termociclador *Master Gradient Eppendorf* que possibilita o teste de diversas temperaturas simultaneamente (*PCR* com gradiente de temperatura), a partir de temperaturas previamente descritas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/sheep>). Foi incluída, em cada reação de *PCR*, uma amostra sem DNA (controle negativo) visando o controle de contaminação. As reações em cadeia da polimerase – *PCR* foram realizadas nos termocicladores *Master Gradient Eppendorf (Eppendorf)*, *PTC-100 (MJResearch)* e *Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. O programa da *PCR* estabelecido foi: 94°C por 5 min; 94°C por 1 min; temperatura de anelamento por 1 min; 72°C por 1 min; as etapas anteriores repetidas 34 vezes e extensão a 72°C por 30 min; variando a temperatura de anelamento (43 a 63°C) de acordo com o iniciador utilizado.

A qualidade da amplificação foi avaliada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (0,6 µg/ml) utilizando como referência o marcador de peso molecular de 1 Kb *Plus* (Invitrogen) e visualização sob luz ultravioleta. A eletroforese horizontal foi realizada a 120 Volts, em torno de uma hora, de acordo com o tamanho (pb) dos fragmentos e a fotodocumentação por meio do equipamento *Eagle Eye™ II (Stratagene)*.

**Tabela 2.3:** Condições da reação em cadeia da polimerase (*PCR*) para os marcadores genéticos do tipo microssatélite analisados. Para todos os marcadores foi utilizado solução com 2,5 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 unidade de Taq DNA polimerase por reação e 10% do volume total da reação de Tampão 10x (Tris/HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 0,1 mM pH 8,0); TP = temperatura de anelamento. Nas reações dos marcadores com \* foi acrescentado 1,6µl de BSA (2,5mg/µl).

Marcador	Reagentes (em µl)			N <sup>o</sup> Ciclos	TP (°C)
	Iniciador (10 µM)	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	DNA (3ng)		
INRA23	5	2,0	9,0	35	43
MAF214	3	2,0	9,0	40	55
MAF65	3	2,0	18,0	40	53
OarAE129	5	1,5	18,0	40	55
OarFCB304	5	1,5	18,0	40	55
ILSTS11	3	1,5	18,0	35	53
INRA63	10	1,5	9,0	35	55
INRA35*	8	1,5	9,0	40	51
BM827	10	2,5	9,0	35	56
OarFCB48*	10	1,0	9,0	40	59
ILSTS05*	10	1,0	9,0	35	55
OarFCB20	2	2,5	9,0	35	59
OMHC1*	5	1,0	9,0	35	54
ILSTS87	8	1,5	9,0	40	56
SRCRSP05	10	2,0	9,0	35	56
BM6526	10	3,0	9,0	40	63

### 3.4 Eletroforese capilar e genotipagem

Para a genotipagem, realizada por eletroforese capilar em seqüenciador automático, os produtos das PCRs foram organizados em grupos (*multiplexes*) com base no tamanho do fragmento amplificado e de acordo com a marcação fluorescente. Os produtos de diferentes PCRs, do mesmo animal, para cada *multiplex* foram incluídos em um mesmo poço da placa de policarbonato com 96 poços, em fundo “V”, e enviados para o seqüenciador. As amostras foram preparadas utilizando as condições descritas na Tabela 3.4, posteriormente desnaturadas a 96°C por cinco minutos e, imediatamente, resfriadas em gelo picado para evitar o pareamento das fitas de DNA do material amplificado. A análise dos fragmentos de cada amostra foi baseada em um padrão de tamanho molecular, marcado com fluorescência ROX, desenvolvido por Brondani e Grattapaglia (2001). A identificação inicial dos fragmentos foi realizada utilizando o programa *GeneScan*<sup>TM</sup> 3.7 (*Applied Biosystems*) e, posteriormente, para identificação dos polimorfismos, a genotipagem e definição dos alelos realizada pelo programa *Genotyper* 3.7 (*Applied Biosystems*). O programa AleloBin (Amos e cols, 2006) foi utilizado para fins de arredondamento das classes alélicas identificadas durante a genotipagem.

**Tabela 2.4** Protocolo de preparo dos produtos de amplificação para genotipagem em seqüenciador automático *ABI Prism 3100*®

Reagentes	( $\mu$ l)
Produto amplificado	1,00
Água	0,75
ROX* (12x)	1,00
Formamida Hi-Di	7,25
Total	10

\* Brondani e Grattapaglia (2001)

### 3.5 Análise estatística

As amostragens dos animais do rebanho de conservação e de fora dele foram denominadas, OCLFR (ovino crioulo lanado Fronteira Rebanho), OCLSR (ovino crioulo lanado Serrana Rebanho), OCLF (ovino crioulo lanado Fronteira) e OCLS (ovino crioulo lanado Serrana); para efeito de análise estatística foram consideradas populações. Para cada amostra populacional foram estimados parâmetros visando à

caracterização da estrutura genética das mesmas. As frequências gênicas, heterozigose esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) e a probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p$ ) foram obtidos utilizando o programa Arlequim 3.0 (Schneider, 2000). A diversidade alélica por loco e diversidade alélica média por população foram obtidos por contagem manual. O *PIC* (*Conteúdo Informativo de Polimorfismo*) por loco foi estimado usando o programa Cervus (Marshall *et al.*, 1998).

A avaliação do valor  $p$  (probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg) foi realizada considerando um  $\alpha$  (*alfa*) de 5%. A correção de Bonferroni foi empregada quando a população apresentou desequilíbrio para algum loco, e representa a diminuição do valor de  $\alpha$  com base no número de testes efetuados. Neste caso, o  $\alpha$  com correção de Bonferroni foi de 0,003 (0,05/16). O índice de endogamia,  $F_{IS}$ , e seu  $p$ -valor, assim como a riqueza alélica, foram estimados utilizando o software FSTAT (Goudet, 2002). O  $F_{ST}$  e a análise de variância molecular (AMOVA) foram realizadas por meio do programa Arlequim 3.0 (Schneider, 2000).

A árvore de relacionamento tipo rede de Neighbor joining (Neighbor net) foi obtida com o uso do programa SplitsTree4 (Huson & Bryant, 2006). A análise de componentes principais (PCA) e outras dela derivadas, como a análise de coordenada principal (PCO), são formas de simplificação de dados multivariados. As frequências alélicas encontradas para as populações em análise foram utilizadas para gerar matrizes de distância utilizando a distância de Nei (1972) construída pelo programa GENDIST do pacote PHILIP (Felsenstein, 1993). As matrizes de distância foram convertidas em gráficos de coordenada principal com o intuito de simplificar a interpretação das distâncias obtidas entre todas as populações. As matrizes de distância, assim geradas, foram utilizadas para a construção de gráficos de coordenada principal pelo programa NTSYS (Rohlf, 1998).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para avaliar a variabilidade genética em raças de diferentes espécies, bem como a variação encontrada entre raças.

Na tabela 2.5 estão apresentadas as frequências alélicas e parâmetros de variabilidade genética estimados para as cinco populações analisadas: animais Fronteira de fora e do rebanho de conservação (OCLF e OCLFR), Serrana de fora e do rebanho de conservação (OCLS e OCLSR) e da raça *Corriedale* (OC) para os 16 marcadores autossômicos do tipo microssatélites.

O número médio de indivíduos analisados (Tabela 2.5) variou de 43,375 para o OCLFR a 4,375 para o OCLSR, sendo que o baixo número de indivíduos amostrados para OCLSR foi decorrente de sua baixa representatividade no rebanho de conservação. A variação no número amostral foi diretamente correlacionada com o número médio de alelos por loco: o menor valor ( $3,562 \pm 1,153$ ) foi observado para OCLSR e o maior ( $7,688 \pm 2,301$ ) para OCLFR. O número médio de alelos por loco não representa a diferença na variabilidade entre os ecótipos visto que o número amostral é diferente entre eles. Dessa forma, é provável que os valores observados estejam em função da amostragem e não de uma maior variabilidade de um dos ecótipos. Essa sugestão é corroborada pela avaliação da riqueza alélica, onde o número de alelos é ponderado pelo tamanho amostral, como já descrito em Material e Métodos. A riqueza alélica foi similar entre as populações, variando de 2,571 em Serrana rebanho a 2,785 em Serrana.

Em relação aos alelos modais não houve consenso para a maioria dos marcadores. Dentre os locos em que foi observado consenso, o maior número de exceções foi na população de Serrana do rebanho. O alelo ILSTS05\*6 foi o único consensual, isto é, foi o modal para todas as populações. Os alelos OARAE129\*9, ILSTS11\*8 e INRA63\*5 foram os modais em todas as populações exceto em Serrana do rebanho, onde os alelos OARAE129\*9 e o INRA63\*5 não foram encontrados. O alelo SRCRSP05 foi bimodal (SRCRSP0\*3 e SRCRSP0\*5) e este padrão foi consenso, com exceção de Serrana rebanho que não apresentou o alelo 3. Os alelos BM6526\*10 e MAF214\*3 foram modais em todas as populações, exceto em *Corriedale* e Serrana, respectivamente. O BM827\*4 também foi modal em todos, exceto em Serrana onde o alelo BM827\*5 foi o mais freqüente, sendo que neste caso Serrana rebanho apresentou 50% de cada um dos alelos (Tabela 2.5).



O compartilhamento de alelos e o total de alelos exclusivos são parâmetros que podem ser úteis para verificar as diferenças e semelhanças genéticas entre raças/ecótipos assim como, também, para inferir sobre a ocorrência de introgressão gênica. De acordo com os dados apresentados na Tabela 2.5, foi possível verificar a ocorrência tanto de compartilhamento quanto de exclusividade de alelos.

Com relação ao compartilhamento de alelos, todas as combinações possíveis foram verificadas. As populações do ecótipo Fronteira, OCLF e OCLFR, compartilharam 65,71% (92/140) do total de alelos. Em OCLFR foram encontrados 17,86% (25/140) de alelos que não foram observados fora do rebanho de conservação, enquanto que em OCLF apenas 14,28% (20/140). Por sua vez, as populações do ecótipo Serrana OCLS e OCLSR, compartilharam 38,76 % (50/129) do total de alelos. Em OCLS foram encontrados 55,81% (72/129) do total de alelos, enquanto que em OCLSR apenas 5,43%(7/129). Nestes percentuais não estão incluídos os alelos que foram exclusivos para cada uma das populações.

Os alelos MAF214\*3, OARFCB304\*14 e ILSTS87\*6 foram compartilhados entre as duas populações de Fronteira (OCLF e OCLFR) e a raça *Corriedale*. A frequência do alelo MAF214\*3 foi similar em ambas e, o alelo OARFCB304\*14 apresentou alta frequência considerando as três populações analisadas. O alelo ILSTS87\*6 apresentou frequência maior em *Corriedale* (13,6%) do que nas populações de Fronteira (3,9 e 1,5%, OCLF e OCLFR, respectivamente), sugerindo que este seja um alelo originário de *Corriedale* que sofreu introgressão gênica em Fronteira (Tabela 2.5).

Com relação ao compartilhamento de alelos entre *Corriedale* e Serrana, apenas um alelo, INRA63\*7, foi encontrado exclusivamente na amostra de Serrana do rebanho de conservação e na raça *Corriedale*. Nesse caso, foi observada uma baixa frequência em *Corriedale* (4,5%) e alta frequência (62,5%) no rebanho de conservação. Sugere-se que esse alelo foi originalmente de Serrana e sofreu introgressão gênica em *Corriedale*. Uma segunda sugestão possível, porém não provável, é que esse alelo era de *Corriedale* e sofreu introgressão em Serrana. Neste segundo caso, como o número de animais do ecótipo Serrana introduzido inicialmente no rebanho foi baixo, pode-se pensar que houve efeito fundador, tendo como consequência o aumento da frequência do referido alelo no rebanho.

Houve compartilhamento de alelos entre as populações de crioulos e a raça *Corriedale* em proporção muito similar. Os valores variaram de 0,331 em Serrana a 0,366 em Fronteira rebanho. O compartilhamento de alelos entre ovinos crioulos lanados e ovinos da raça *Corriedale* pode ser devido à ancestralidade comum e/ou introgressão gênica. Os alelos compartilhados, possivelmente, devem ser encontrados nas demais raças de ovinos e podem refletir, apenas, o compartilhamento de regiões genômicas entre membros de uma mesma espécie. Porém, aqueles que foram encontrados em Fronteira ou em Serrana e na raça *Corriedale* podem indicar introgressão gênica.

A comparação das cinco populações (OCLF, OCLFR, OCLS, OCLSR e *Corriedale*) mostrou que os alelos INRA23\*14, ILSTS05\*5, OARFCB20\*2, OARFCB48\*13, ILSTS87\*4 são exclusivos da raça Fronteira, compartilhados entre as duas populações, OCLF e OCLFR. Os alelos OARAE304\*1, OARFCB20\*7, OARFCB48\*14 e OARFCB20\*16 foram encontrados exclusivamente no rebanho de conservação, enquanto que OARAE304\*5, INRA35\*15, ILSTS05\*1 e OARFCB20\*1 só foram encontrados em animais Fronteira de fora do rebanho de conservação. Com relação ao ecótipo Serrana, foram observados os seguintes alelos exclusivos compartilhados pelas duas populações, OCLS e OCLSR: INRA23\*11, MAF214\*1, INRA35\*14, ILSTS05\*4, OMHC1\*7 e BM6526\*12. Os alelos OARAE129\*3, OARAE304\*21, OARFCB48\*7, ILSTS05\*8, OMHC1\*5, BM6526\*4 e BM6526\*13 foram encontrados apenas em OCLS, sugerindo que sejam alelos diagnósticos desse ecótipo, porém não estão representados no rebanho de conservação.

A avaliação da heterozigose e do conteúdo informativo de polimorfismo (*PIC*) nas populações fornece informações sobre a variabilidade genética das mesmas. A heterozigose média observada foi menor do que a esperada para todas as populações, o que reflete um déficit no número de heterozigotos com relação ao esperado e um conseqüente excesso de homozigotos (Tabela 2.5).

Os valores estimados para o *PIC* foram, na sua maioria, baixos. Apenas 10% dos valores estimados foram superiores a 80%. Os maiores valores foram observados para o loco OARFCB20, um dos marcadores com maior número de alelos (14 alelos), inferior apenas ao OARFCB304 (15 alelos). O menor valor de *PIC* (0,3242) foi observado para o MAF214, na raça *Corriedale* (Tabela 2.5).

Com relação à aderência ao EHW, considerando um  $\alpha$  de 5%, foram observados vários marcadores que não aderiram ao equilíbrio, com exceção da população OCLSR em que apenas o loco OarFCB20 apresentou desvio nas frequências genotípicas observadas e esperadas (Tabela 2.5). A população OCLS apresentou 50% dos marcadores fora do equilíbrio, enquanto as populações do ecótipo Fronteira, OCLFR e OCLF, apresentaram 50 e 37,5%, respectivamente; e a raça *Corriedale* 43,8%. A utilização da correção de Bonferroni alterou o valor de  $\alpha$  para 0,003 e, como consequência, um maior número de locos aderiu ao EHW, continuando, porém, um alto número de locos em desequilíbrio.

Esse número alto de locos fora do equilíbrio é freqüentemente encontrado quando as amostras são advindas de rebanhos de animais zootécnicos, pois nestes há diversas premissas do Teorema de Hardy-Weinberg que não são seguidas. Quando se trabalha com rebanhos de animais zootécnicos observa-se que: o número de reprodutores é muito pequeno em relação ao número de matrizes; há introdução de animais de outros rebanhos (migração), especialmente reprodutores; os acasalamentos são direcionados (ausência de panmixia) e pode haver cruzamento entre animais aparentados mesmo quando há controle dos acasalamentos, inclusive, sobreposição de gerações (acasalamento pai-filha).

Vários dos fatores citados acima ocorreram nos rebanhos analisados, sugerindo que estes possam ter contribuído para que as populações não se encontrassem em equilíbrio para a maioria dos locos genéticos. Corroborando esta possibilidade, Pein *et al.* (1995) comentam que quando um microssatélite está fora do EHW em várias populações, indica que a população está sob alguma força que muda as frequências genotípicas: mutação, seleção ou deriva. Mutações, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural influenciam a variação entre genomas e populações (Bruford *et al.*, 2003; Luikart *et al.*, 1998). O elevado número de locos fora do EHW pode ser decorrente de subestruturação reprodutiva (Marmi *et al.*, 2007), o que é possível estar associado aos resultados encontrados nas populações aqui analisadas, especialmente no rebanho de conservação, considerando a divisão do rebanho em grupos, desde o início de sua formação, e o manejo reprodutivo adotado há duas décadas e meia.

Além desses fatores, desequilíbrios de HW em um dado loco para diferentes populações podem refletir problemas metodológicos, como de amplificação do microssatélite ou erros de genotipagem (Pompanon *et al.*, 2005). Apesar de poder

ocorrer problemas metodológicos em qualquer trabalho laboratorial, neste caso parece não ser a explicação mais provável, visto que, para a maioria dos locos não houve consenso entre as populações. Nenhum loco apresentou desequilíbrio em todas as populações, sendo que os marcadores OarAE129, ILSTS87 e SRCRSP05 foram os que se apresentaram fora do EHW para um número maior de populações.

As populações que apresentaram mais locos fora do EHW, mesmo após a correção de Bonferroni, foram aquelas de fora do rebanho de conservação e a raça *Corriedale*. Há duas possibilidades: o manejo reprodutivo está sendo mais intenso nestas populações ou elas não compõem uma população real. As duas possibilidades podem estar ocorrendo. Os animais não habitam a mesma fazenda, mas a mesma região geográfica e são do mesmo ecótipo. Os animais foram amostrados em municípios diferentes, na região de ocorrência do OCL, porém são relativamente próximos e há, em alguns casos, intercâmbio de animais entre os criadores. A coleta de sangue foi realizada em épocas diferentes, portanto a amostragem é composta de duas sub-amostras e pode ter levado ao que se conhece como fator temporal de amostragem. Com relação à *Corriedale*, as amostras foram acessadas no Banco de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A existência de alelos nulos não pode ser excluída, porém não foi verificada nas análises. Alelos nulos são ausência de amplificações ou amplificações parciais de um determinado loco causado por mutações ou alterações na seqüência de pareamento dos iniciadores, o que tende a aumentar o número de homozigotos na amostra e, como consequência, conclusões errôneas sobre o EHW, desequilíbrio de ligação entre os locos e erro de exclusão de paternidade (Paiva, 2005). Dentre os marcadores utilizados, foi confirmada a existência de alelo nulo para o loco OarAE129, recomendado pela FAO para a espécie ovina, tendo sido indicado um novo par de alelos para a genotipagem desse loco (Peter *et al.*, 2005).

Os valores estimados de  $F_{IS}$  revelam que há endogamia em todas as populações ( $p < 0,05$ ). O maior valor total de  $F_{IS}$  foi observado em *Corriedale* (0,233) e o menor em Fronteira do rebanho (0,099). Alguns marcadores apresentaram valores excepcionalmente altos, como MAF214 e SRCRSP05 em Fronteira; OARAE129 em Fronteira do rebanho; OARAE129 e SRCRSP05 em Serrana; OARAE129, INRA63, BM827 e SRCRSP05 em Serrana do rebanho; e OARAE129, OARFCB304, INRA63, OMHC1, ILSTS87 e SRCRSP05, em *Corriedale* (Tabela 2.6).

**Tabela 2.5** Frequências alélicas, número de alelos totais, tamanho amostral por marcador (N), heterozigose observada (Ho) e esperada (He) por loco, *p*-valor do teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o *PIC* para 16 marcadores do tipo microssatélites em quatro populações de ovinos crioulos lanados: Fronteira, Fronteira do rebanho de conservação, Serrana, Serrana do rebanho de conservação e a raça *Corriedale*. Em negrito encontram-se os locos por população que não apresentaram aderência ao EHW e os valores de  $p < 0,003$  (alfa após a correção de Bonferroni).

Loco/alelos	POPULAÇÕES				
	Fronteira	Fronteira Reb	Serrana	Serrana Reb	<i>Corriedale</i>
<b>INRA23</b>					
02	0,019	-	-	-	-
03	-	0,519	-	0,500	0,333
04	0,352	0,135	0,292	-	0,167
05	0,093	-	0,028	-	0,056
06	-	0,096	0,014	-	0,167
07	0,111	0,173	0,208	0,100	0,222
08	0,352	-	0,082	-	-
09	-	-	0,014	-	-
10	0,018	-	0,125	-	-
11	-	-	0,056	0,100	-
12	-	0,039	0,028	0,300	0,055
13	0,018	0,019	0,153	-	-
14	0,037	0,019	-	-	-
N° alelos = 13					
N	27	26	36	5	9
Ho	0,74074	0,69231	0,77778	0,60000	0,88889
He	0,74284	0,68401	0,83216	0,71111	0,82353
p-valor	0,80773	0,01278	0,50132	0,31744	0,77204
PIC	(±0,00075)	(±0,00028)	(±0,00111)	(±0,00112)	(±0,00159)
<b>MAF214</b>					
01	-	0,250	0,032	0,125	-
03	0,054	0,028	-	-	0,039
04	0,554	0,611	0,468	0,625	0,769
05	0,392	0,111	0,500	0,250	0,192
N° alelos = 04					
N	28	18	31	4	13
Ho	0,32143	0,66667	0,48387	0,75000	0,46154
He	0,54610	0,56667	0,53887	0,60714	0,38462
p-valor	0,00751	0,11046	0,03260	1,00000	1,00000
PIC	(±0,00025)	(±0,00103)	(±0,00054)	(±0,00000)	(±0,00000)
PIC	0,4391	0,4928	0,4198	0,4683	0,3242

Loco/alelos	POPULAÇÕES				
	Fronteira	Fronteira Reb	Serrana	Serrana Reb	<i>Corriedale</i>
<b>MAF65</b>					
01	-	-	-	-	0,024
02	-	0,012	0,014	-	-
03	0,100	0,195	0,203	0,200	0,429
04	0,475	0,268	0,284	0,500	0,167
05	0,225	0,342	0,242	0,300	0,262
06	0,025	0,110	0,107	-	0,024
07	-	0,024	0,041	-	0,047
08	0,175	0,024	0,095	-	0,047
09	-	0,024	0,014	-	-
Nº alelos = 09					
N	20	41	37	5	21
Ho	0,65000	0,73171	0,89189	0,60000	0,57143
He	0,70000	0,76874	0,80748	0,68889	0,73171
p-valor	0,29067 (±0,00126)	0,10640 (±0,00086)	0,24374 (±0,00084)	0,11535 (±0,00100)	0,18078 (±0,00075)
PIC	0,6362	0,7218	0,7671	0,5478	0,6719
<b>OARAE129</b>					
02	0,143	0,330	0,135	0,700	0,100
03	-	-	0,077	-	-
08	0,179	0,234	0,327	-	0,432
09	0,607	0,436	0,422	-	0,400
10	0,071	-	0,039	0,300	0,068
Nº alelos = 05					
N	29	47	26	5	15
Ho	0,53571	0,40426	0,38462	0,20000	0,26667
He	0,58442	0,65317	0,70211	0,46667	0,65977
p-valor	0,60262 (±0,00130)	<b>0,00000</b> (±0,00000)	<b>0,00023</b> (±0,00005)	0,33753 (±0,00145)	<b>0,00179</b> (±0,00013)
PIC	0,5298	0,5721	0,6355	0,3318	0,5676
<b>OARFCB304</b>					
01	-	0,026	-	-	-
05	0,015	-	-	-	-
07	-	-	-	-	0,026
08	-	0,079	0,013	-	0,105
09	-	0,211	-	-	-
12	-	-	-	-	0,026
13	0,162	0,053	0,622	0,500	0,553
14	0,234	0,316	-	-	0,158
15	-	0,026	-	-	-
16	-	-	-	0,250	-
17	0,456	0,184	0,122	0,250	0,132
19	0,118	0,079	0,095	-	-
20	-	0,026	0,027	-	-

Loco/alelos	POPULAÇÕES				
	Fronteira	Fronteira Reb	Serrana	Serrana Reb	<i>Corriedale</i>
21	-	-	0,080	-	-
24	0,015	-	0,041	-	-
N° alelos = 15					
N	34	19	37	2	19
Ho	0,55882	0,73684	0,51351	1,00000	0,36842
He	0,70676	0,82646	0,58867	0,83333	0,65718
p-valor	0,02321	0,10918	0,04192	1,00000	<b>0,00000</b>
	(±0,00039)	(±0,00100)	(±0,00052)	(±0,00000)	<b>(±0,00000)</b>
PIC	0,6513	0,7797	0,5546	0,5547	0,6045
<b>ILSTS11</b>					
01	0,167	0,278	0,250	0,500	0,222
02	-	-	-	-	0,028
04	0,197	0,144	0,021	0,166	0,167
05	0,061	0,033	0,104	-	-
06	0,045	0,133	0,125	-	0,222
07	0,045	0,056	0,167	0,167	-
08	0,485	0,356	0,333	0,167	0,361
N° alelos = 07					
N	33	45	24	3	18
Ho	0,72727	0,68889	0,70833	1,00000	0,66667
He	0,70117	0,76205	0,78812	0,80000	0,76349
p-valor	0,69757	0,20798	0,16433	1,00000	0,20019
	(±0,00182)	(±0,00099)	(±0,00133)	(±0,00000)	(±0,00144)
PIC	0,6523	0,7156	0,7370	0,6204	0,6985
<b>INRA63</b>					
02	0,194	-	0,262	-	-
04	0,011	-	0,024	-	0,045
05	0,489	0,633	0,381	-	0,772
06	0,136	0,112	0,024	-	0,115
07	-	-	-	0,625	0,045
08	-	0,010	-	-	-
09	0,068	0,112	0,106	-	-
11	0,023	0,051	0,012	-	-
12	0,034	0,082	0,024	0,375	0,023
15	0,011	-	0,012	-	-
16	0,023	-	0,155	-	-
17	0,011	-	-	-	-
N° alelos = 12					
N	44	49	42	4	22
Ho	0,75000	0,42857	0,80952	0,25000	0,04545
He	0,70611	0,57101	0,75789	0,53571	0,39429
p-valor	0,59097	0,00410	0,71325	0,42607	<b>0,00000</b>
	(±0,00080)	(±0,00023)	(±0,00157)	(±0,00155)	<b>(±0,00000)</b>
PIC	0,6657	0,5367	0,7123	0,3589	0,3642

Loco/alelos	POPULAÇÕES				
	Fronteira	Fronteira Reb	Serrana	Serrana Reb	<i>Corriedale</i>
<b>INRA35</b>					
01	-	0,010	-	-	-
02	0,109	0,031	0,052	-	-
03	0,044	0,112	0,042	0,300	0,046
07	0,054	0,010	0,115	-	0,136
08	0,022	0,031	0,125	0,200	0,295
10	0,054	0,020	0,010	-	0,023
11	0,315	-	0,208	-	-
12	0,217	0,255	0,281	0,100	0,250
13	0,044	0,245	0,146	0,100	0,250
14	0,086	0,031	0,021	0,100	-
15	0,022	-	-	-	-
16	0,033	0,255	-	0,200	-
Nº alelos = 12					
N	46	49	48	5	22
Ho	0,78261	0,75510	0,72917	0,80000	0,63636
He	0,83134	0,80202	0,83114	0,88889	0,78436
p-valor	0,12223 (±0,00064)	0,01202 (±0,00019)	<b>0,00002</b> (±0,00001)	0,61100 (±0,00118)	0,07199 (±0,00074)
PIC	0,8031	0,7636	0,8	0,7716	0,7278
<b>BM827</b>					
01	-	-	0,143	-	-
02	0,233	-	0,225	-	-
03	-	-	0,036	-	-
04	0,384	0,444	0,095	0,500	0,406
05	0,336	0,333	0,286	0,500	0,438
06	0,012	0,056	0,048	-	-
07	0,035	0,167	0,167	-	0,156
Nº alelos = 07					
N	43	45	42	3	16
Ho	0,62791	0,46667	0,78571	0,33333	0,50000
He	0,69166	0,66792	0,81612	0,60000	0,63911
p-valor	0,72528 (±0,00142)	0,03103 (±0,00048)	0,37987 (±0,00110)	1,00000 (±0,00000)	0,34990 (0,00165)
PIC	0,6210	0,5974	0,7795	0,3750	0,5386
<b>OARFCB48</b>					
02	0,122	0,009	0,096	-	0,023
03	-	0,109	0,053	0,300	0,045
04	0,379	0,164	0,383	-	0,295
05	0,156	0,255	0,160	0,400	0,273
06	0,022	0,127	0,075	-	0,114
07	-	-	0,011	-	-
08	0,022	0,027	0,085	-	0,091
09	0,022	0,073	0,011	0,100	-



Loco/alelos	POPULAÇÕES				
	Fronteira	Fronteira Reb	Serrana	Serrana Reb	<i>Corriedale</i>
12	0,078	0,046	0,075	-	-
13	0,044	0,091	-	-	-
14	-	0,027	-	-	-
17	0,033	0,018	-	0,200	0,068
19	0,122	0,055	0,053	-	0,091
Nº alelos = 13					
N	45	55	47	5	22
Ho	0,82222	0,74545	0,70213	0,80000	0,59091
He	0,80824	0,87173	0,80302	0,77778	0,82030
p-valor	0,06723	<b>0,00220</b>	0,24685	0,70682	<b>0,00000</b>
	(±0,00054)	<b>(±0,00008)</b>	(0,00093)	(±0,00123)	<b>(±0,00000)</b>
PIC	0,7801	0,8498	0,7746	0,6454	0,7758

**ILSTS05**

01	0,014	-	-	-	-
02	0,071	0,055	0,013	-	0,024
03	-	0,009	-	-	0,024
04	0,029	0,009	0,154	0,100	-
05	0,086	0,018	-	-	-
06	0,414	0,545	0,461	0,400	0,452
07	0,157	0,100	0,192	0,300	0,286
08	-	-	0,039	-	-
09	0,229	0,264	0,141	0,200	0,214
Nº alelos = 09					
N	35	55	39	5	21
Ho	0,54286	0,61818	0,61538	0,60000	0,85714
He	0,74865	0,62519	0,71395	0,77778	0,68293
p-valor	0,00800	0,18375	0,01141	0,70131	0,69705
	(±0,00028)	(±0,00111)	(±0,00023)	(±0,00137)	(±0,00161)
PIC	0,7022	0,5682	0,6654	0,6454	0,6062

**OARFCB20**

01	0,057	-	-	-	-
02	0,057	0,018	-	-	-
03	0,200	0,382	0,179	-	0,159
04	0,178	0,136	0,179	0,500	0,273
05	0,189	0,109	0,179	0,100	0,250
06	0,033	0,027	0,048	-	0,023
07	-	0,009	-	-	-
08	0,122	0,073	0,106	0,200	0,068
09	0,122	0,146	0,106	0,100	0,136
10	-	0,009	0,012	-	0,023
11	0,021	0,018	0,036	-	-
12	-	0,018	0,095	-	-
15	0,021	0,046	0,060	0,100	0,068
16	-	0,009	-	-	-
Nº alelos = 14					
N	45	55	42	5	22

Loco/alelos	POPULAÇÕES				
	Fronteira	Fronteira Reb	Serrana	Serrana Reb	<i>Corriedale</i>
Ho	0,82222	0,76364	0,66667	0,40000	0,90909
He	0,86417	0,80050	0,87550	0,75556	0,82770
p-valor	0,27067	0,19034	<b>0,00026</b>	0,04393	0,94534
PIC	(±0,00081)	(±0,00049)	<b>(±0,00005)</b>	(±0,00055)	(±0,00051)
	0,8378	0,7727	0,8503	0,642	0,7828
<b>OMHC1</b>					
02	-	0,048	0,024	0,200	0,088
05	-	-	0,037	-	-
06	0,053	-	0,012	-	0,088
07	-	0,010	0,232	0,400	-
08	0,276	0,125	0,134	-	0,118
09	0,263	0,289	0,378	0,300	0,206
10	0,145	0,260	0,098	-	0,029
11	0,118	0,172	0,024	0,100	0,235
12	0,105	0,086	0,012	-	0,088
13	0,040	0,010	0,049	-	0,148
Nº alelos = 10					
N	38	52	41	5	17
Ho	0,65789	0,80769	0,82927	0,80000	0,47059
He	0,81474	0,80153	0,78019	0,77778	0,86809
p-valor	0,01113	0,65910	0,45152	0,07331	<b>0,00024</b>
PIC	(±0,00030)	(0,00139)	(±0,00078)	(±0,00059)	<b>(±0,00005)</b>
	0,7770	0,7640	0,7418	0,6454	0,8235
<b>ILSTS87</b>					
01	-	0,088	-	0,700	0,135
02	0,026	-	0,018	-	-
03	0,205	0,221	0,446	-	0,182
04	0,256	0,191	-	-	-
05	-	0,073	0,018	0,200	0,182
06	0,039	0,015	-	-	0,136
07	0,013	0,059	0,018	-	0,046
08	0,192	0,147	0,089	-	0,227
09	0,103	0,059	0,125	-	0,046
10	0,128	0,103	0,286	0,100	-
11	0,038	0,044	-	-	0,046
Nº alelos = 11					
N	39	34	28	5	11
Ho	0,58974	0,70588	0,42857	0,40000	0,45455
He	0,83516	0,87401	0,70714	0,51111	0,87879
p-valor	<b>0,00026</b>	0,00356	<b>0,00146</b>	0,32782	<b>0,00096</b>
PIC	<b>(±0,00005)</b>	(±0,00013)	<b>(±0,00011)</b>	(±0,00144)	<b>(±0,00008)</b>
	0,8015	0,8462	0,6479	0,4102	0,8184

Loco/alelos	POPULAÇÕES				
	Fronteira	Fronteira Reb	Serrana	Serrana Reb	Corriedale
<b>SRCRSP05</b>					
01	-	-	-	-	0,050
02	0,048	0,077	0,057	0,375	0,125
03	0,369	0,327	0,341	-	0,475
04	0,107	0,048	0,159	0,250	0,050
05	0,476	0,529	0,432	0,375	0,225
06	-	0,019	0,011	-	0,075
Nº alelos = 06					
N	42	52	44	4	20
Ho	0,42857	0,48077	0,38636	0,25000	0,35000
He	0,63081	0,61072	0,67633	0,75000	0,70641
p-valor	<b>0,00164</b> (±0,00011)	0,00662 (±0,00023)	<b>0,00000</b> (±0,00000)	0,13893 (±0,00105)	<b>0,00000</b> (±0,00000)
PIC	0,5515	0,5384	0,6078	0,5815	0,6469
<b>BM6526</b>					
02	0,023	-	0,011	-	0,023
04	-	-	0,011	-	-
05	0,047	0,077	0,011	0,100	0,068
06	0,209	0,106	0,156	0,100	0,386
07	0,023	0,038	0,089	-	0,023
08	0,035	-	0,011	-	0,068
09	0,256	0,298	0,133	0,100	0,227
10	0,314	0,433	0,511	0,600	0,136
11	0,070	0,038	0,033	-	0,023
12	0,023	0,010	0,011	0,100	-
13	-	-	0,023	-	-
14	-	-	-	-	0,046
Nº alelos = 12					
N	43	52	45	5	22
Ho	0,72093	0,76923	0,68889	0,60000	0,77273
He	0,79152	0,71060	0,69438	0,66667	0,78541
p-valor	0,80000 (±0,00074)	0,11603 (±0,00069)	0,10198 (±0,00037)	0,59556 (±0,00135)	0,60799 (±0,00079)
PIC	0,7509	0,6591	0,6577	0,5700	0,7389
Nº médio de cópias gênicas	73,750 (±15,830)	86,750 (±25,000)	76,125 (±14,778)	8,750 (±1,915)	36,250 (±8,513)
N (média)	36,875	43,375	38,0625	4,375	18,125
Nº médio de alelos	7,125 (±2,527)	7,438 (±2,851)	7,688 (±2,301)	3,562 (±1,153)	6,111 (±1,537)
APS	0,333	0,366	0,331	0,361	0,362
Riqueza alélica	2,734	2,720	2,785	2,571	2,696
Ho (média)	0,64243 (±0,14124)	0,65387 (±0,13305)	0,65010 (±0,16359)	0,58646 (±0,26021)	0,48204 (±0,24129)
He (média)	0,73148 (±0,09167)	0,72477 (±0,10228)	0,74457 (±0,09168)	0,69678 (±0,12223)	0,72871 (±0,14741)

**Tabela 2.6.** Valores de  $F_{IS}$  e p-valor para os 16 marcadores do tipo microssatélites analisados nas cinco populações.

Marcadores	POPULAÇÕES									
	Fronteira		Fronteira Rebanho		Serrana		Serrana Rebanho		Corriedale	
	Fis	p-valor	Fis	p-valor	Fis	p-valor	Fis	p-valor	Fis	p-valor
INRA23	0,0030	0,5763	-0,0120	0,6357	0,0660	0,2383	0,1720	0,4258	-0,0850	0,8425
MAF214	0,4160	0,0102	-0,1830	0,9229	0,1040	0,3285	-0,2860	1,0000	-0,2100	1,0000
MAF65	0,0730	0,3749	0,0490	0,3357	-0,1060	0,9501	0,1430	1,0000	0,2230	0,0595
OARAE129	0,0850	0,3158	0,3840	0,0003	0,4570	0,0003	0,6000	0,3359	0,6040	0,0009
OARFCB304	0,2120	0,0322	0,1110	0,2113	0,1290	0,1216	-0,3330	1,0000	0,4460	0,0016
ILSTS11	-0,0380	0,7230	0,0970	0,1481	0,1030	0,2238	-0,3330	1,0000	0,1300	0,2311
INRA63	-0,0630	0,8415	0,2510	0,0045	-0,0690	0,8557	0,5710	0,4298	0,8870	0,0000
INRA35	0,0590	0,2183	0,0590	0,2449	0,1240	0,0444	0,1110	0,4565	0,1920	0,0774
BM827	0,0930	0,2189	0,3040	0,0026	0,0380	0,3616	0,5000	0,5982	0,2230	0,1753
OARFCB48	-0,0180	0,6808	0,1460	0,0056	0,1270	0,0382	-0,0320	0,7206	0,2840	0,0060
ILSTS05	0,2780	0,0028	0,0110	0,5090	0,1400	0,0899	0,2500	0,3136	-0,2630	0,9883
OARFCB20	0,0490	0,2604	0,0460	0,2670	0,2410	0,0003	0,5000	0,0462	-0,1010	0,9223
OMHC1	0,1950	0,0113	-0,0080	0,6057	-0,0640	0,8573	-0,0320	0,7209	0,4660	0,0001
ILSTS87	0,2970	0,0001	0,1950	0,0053	0,3980	0,0006	0,2380	0,3342	0,4950	0,0006
SRCRSP05	0,3230	0,0034	0,2140	0,0230	0,4320	0,0000	0,7000	0,0875	0,5110	0,0002
BM6526	0,0900	0,1528	-0,0830	0,8917	0,0080	0,5309	0,1110	0,6194	0,0170	0,5355
<b>Total</b>	<b>0,1230</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0990</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,1290</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,1730</b>	<b>0,0191</b>	<b>0,2330</b>	<b>0,0000</b>

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que há diferença genética entre todos os pares de populações e combinações entre elas (Tabela 2.7). A menor diferença (0,01921 ) foi estimada para o par Fronteira-Fronteira rebanho e as maiores para os pares Fronteira-Serrana rebanho e Serrana-Serrana rebanho (0,09359 e 0,08037, respectivamente).

**Tabela 2.7.** Porcentagem de diferença entre as populações analisadas e o *p*-valor, estimados pela AMOVA (Analysis of Molecular Variance): na diagonal de baixo encontram-se os valores de  $F_{ST}$  e na de cima os *p*-valores. Os valores em negrito indicam a maior e a menor diferença genética entre pares de populações.

	OCLF	OCLS	OCLFR	OCLSR	OC
OCLF	****	0,00000±0,0000	0,00000±0,0000	0,00000±0,0000	0,00000±0,0000
OCLS	0,02647	****	0,00000±0,0000	0,00000±0,0000	0,00000±0,0000
OCLFR	<b>0,01921</b>	0,03685	****	0,00762±0,0009	0,00000±0,0000
OCLSR	<b>0,09359</b>	0,08037	0,04621	****	0,00950±0,0009
OC	0,03625	0,04484	0,03040	0,05674	****

Da mesma forma, confirmando o observado com AMOVA, a árvore de relacionamento do tipo rede de *Neighbor joining (neighbor-net)* demonstrou que há uma diferença entre a população do rebanho de conservação e a externa a ele. Porém, um dado suplementar que essa árvore revela é que a Serrana do rebanho apresentou maior similaridade com *Corriedale*, o que pode ser devido à ocorrência de introgressão gênica (Figura 2.2). O fato da população Serrana do rebanho de conservação ser muito pequena, pode ter interferido na maior diferença genética entre ela e as demais. O pequeno número inicial de animais Serrana, que permaneceu desde 1991 como um grupo teoricamente fechado, provavelmente, favoreceu a ocorrência do efeito de “gargalo” (*bottleneck*) nessa população.

**Tabela 2.8** Variação genética em diferentes níveis, entre e dentro ovinos crioulos lanados e a raça *Corriedale*. Análise de variância molecular (AMOVA) e valores de  $F_{ST}$  que correspondem a variância entre as populações;  $p < 0,001$ .

Estrutura	Fonte de variação	GL	Variação(%)	$F_{ST}$
OCLF x OCLFR	Entre populações	1	3,06	0,03063
	Dentro das populações	202	96,94	
OCLS x OCLSR	Entre populações	1	6,07	0,06071
	Dentro das populações	104	93,93	
OCLFR x OCLSR	Entre populações	1	6,29	0,06288
	Dentro das populações	118	93,71	
OCLF, OCLS, OCLFR e OCLSR	Entre populações	3	5,03	0,05029
	Dentro das populações	306	94,97	
OCLF, OCLS, OCLFR, OCLSR e OC	Entre populações	4	3,90	0,03902
	Dentro das populações	349	96,10	
OCLF e OC	Entre populações	1	4,71	0,04710
	Dentro das populações	136	95,29	
OCLFR e OC	Entre populações		4,43	0,04429
	Dentro das populações		95,57	
OCLS e OC	Entre populações	1	5,62	0,05622
	Dentro das populações	138	94,38	
OCLSR e OC	Entre populações		7,00	0,07002
	Dentro das populações		93,00	

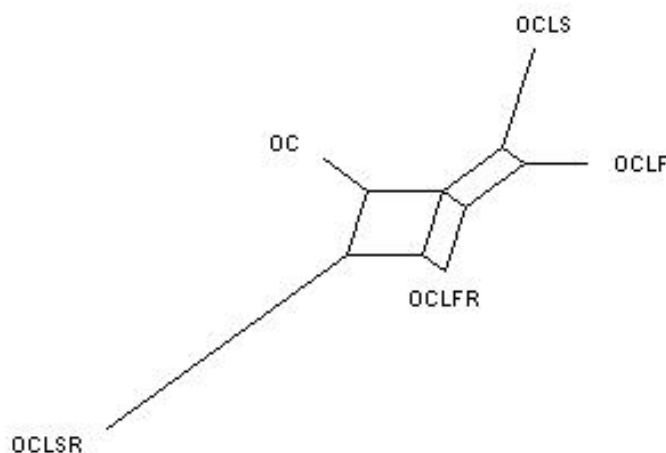


Figura 2.2 Árvore de relacionamento do tipo Neighbor net entre ovinos crioulos lanados e a raça *Corriedale*.

A figura 2.2 mostra o diagrama da primeira e segunda coordenadas principais, que responderam por cerca de 92% da variação observada entre as populações. A primeira coordenada representou 74% e a segunda 18% do total da variabilidade. O eixo X mostrou a separação entre as populações Serrana e Serrana rebanho, enquanto que a segunda separou as demais populações, incluindo a raça *Corriedale*. Essa coordenada evidenciou uma maior similaridade entre as populações do ecótipo Fronteira com a raça *Corriedale*, sugerindo introgressão gênica.

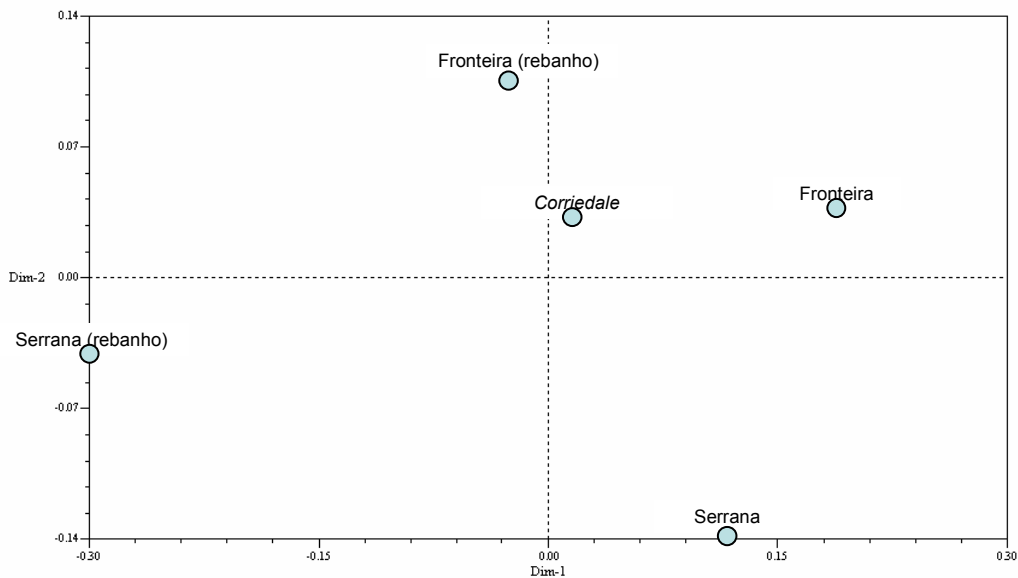


Figura 2.3 Diagrama das duas primeiras coordenadas principais mostrando o relacionamento entre as duas populações de OCL raça Fronteira, as duas OCL ecótipo Serrana e a raça *Corriedale*.

## 5. CONCLUSÕES

✓Os resultados da análise por meio de marcadores microssatélites autossômicos evidenciaram que o rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul não representa toda a variabilidade genética da raça Fronteira e do ecótipo Serrana. Além disso, os animais do rebanho de conservação têm mais introgressão da raça *Corriedale* que os animais de fora dessa população.

✓Com base nos dados, foi observado que há diferença genética entre a população do rebanho de conservação e a externa a ele.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBAO, G.; DENGJUN, W. Microsatellite markers for paternity testing of Liangshan semi-fine wool sheep. **Hereditas**, v. 27, n. 1, p. 85-90, 2005.

ALBUQUERQUE, M. S. M. **Marcadores moleculares e variabilidade genética em búfalos do Brasil**. 95p. 2005. (Tese Doutorado) - UNESP, Ribeirão Preto, SP.

ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A. do; MARQUES, J. R. F.; CIAMPI, A. Y.; MARIANTE, A. da S.; CASTRO, S. T. R.; COSTA, M. R.; PAIVA, S. R.; SILVA, A. C. M.; CONTEL, E. P. B. Variabilidade genética em búfalos determinada por marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 621-628, 2006a.

ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAIVA, S. R.; EGITO, A. A. do; MARQUES, J. R. F.; SILVÉRIO, V. C.; FARIA, D. A. de; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. da S. Phylogenetic analysis in buffaloes in Brazil: relationship between riverine and swamp buffaloes. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte. **Proceedings...** Belo Horizonte : Instituto Prociência, 2006b. CD-ROM.

AMOS, W.; HOFFMANN, I.; FRODSHAM, A.; ZHANG, L.; BEST, S.; HILL, V. S. A. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 10-14, 2007.

ANDERSEN, W. R.; FAIRBANKS, D. J.; MAUGHAM, P. J. **RAPD analysis for Biological Resource Characterization: a laboratory manual**. Provo, Utah: Brigham Young University, 1991.

ARANGUREN-MENDEZ, J.; JORDANA, J.; GOMEZ, M. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. **Genetic Selection Evolution**, v. 33, p. 433-442, 2001.

ARRANZ, J. J.; BAYÓN, Y.; SAM PRIMITIVO, F. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. **Genetic Selection Evolution**, v. 33, p. 529- 542, 2001.

ARRANZ, J. J.; BAYÓN, Y.; SAM PRIMITIVO, F. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. **Animal Genetics**, v. 29, p. 435-440, 1998.

ARRUGA, M. V.; MONTEAGUDO, M. T.; TEJEDOR, M. T.; BARRAO, R.; PONZ, R. Analysis of microsatellites and paternity testing in Rasa Aragonesa sheep. **Research Veterinary Science**, v. 70, n. 3, p. 271-273, 2001.

AVELLANET, R.; RODELLAR, C.; MARTIN-BURIEL, I.; OSTA, R.; PONS, A.; ZARAGOZA, P. Caracterización genética de una raza caprina en peligro de extinción: Mallorquina. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 379-382, 2007.

BAUMUNG, R.; SIMIANER, H.; HOFFMANN, I. Genetic diversity studies in farm animals - a survey. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 121, n. 6, p. 361-374, 2004.

BISHOP, M. D.; KAPPES, S. M.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; SUNDEN, S. L. F.; HAWKINS, G. A.; SOLINAS, TOLDO S.; FRIES, R.; GROSZ, M. D.; YOO, J.; BEATTIE, C. W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v. 136, p. 619-639, 1994.

BODÓ, I. Methods and experiences with in situ preservation of farm animals. In: WIENER, G. (Ed.). **Animal Genetics resources: a global programme for sustainable development**. Rome, 1989. (FAO Animal Production and Health Paper, 80). Proceedings of the Expert Consultation on FAO Programmes for the Preservation of Animal Genetic Resources.

BOZZI, R.; DEGI'INNOCENTI, P.; RIVERA, P.D.; FORABOSCO, F.; SARGENTINI, C.; GIORGETTI, A. Genetic diversity in italian sheep breeds using microsatellite markers. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte. **Proceedings...** Belo Horizonte: Instituto Prociências, 2006. v. único.

BREZINSKY, L.; KEMP, S. J.; TEALE, A. J. ILSTS005 – a polymorphic bovine microsatellite. **Animal Genetics**, v. 24, p. 73, 1993.

BREZINSKY, L.; KEMP S. J.; TEALE, A. J. 5 polymorphic bovine microsatellite (ILSTS010-014). **Animal Genetics**, v. 24, p. 75-76, 1993b.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C. M. S. L.; GENNARI, S. M.; SEQUEIRA, T. C.; BORBA, M. F.; GONÇALVES E GONÇALVES, I.; ECHEVARRIA, F. A. M. Resistência de cordeiros das raças Corriedale e Crioula Lanada frente a infecção natural por *Haemonchus contortus*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador. **Anais...** Salvador, BA: CBPV, 1999a.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C.M.S.L; GENNARI, S.M; SEQUEIRA, T.C; BORBA, M.F; GONÇALVES E GONÇALVES, I; ECHEVARRIA, F.A.M. Resistência de cordeiros das raças Corriedale e Crioula Lanada frente a infecção primária artificial por *Haemonchus contortus*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., Salvador. **Anais...** Salvador, BA: CBPV, 1999b.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C. M. S. L.; NUNES, A.; VAZ, C. Respostas hematológicas, bioquímicas, parasitológicas e histológicas de cordeiros da raça crioula lanada frente a infecção natural por *Haemonchus contortus*. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2., Brasília. **Anais...** Brasília: CENARGEN, 1999c.

BRICARELLO, P. A.; VAZ, C.M.S.L; BORBA, M.F.S; ECHEVARRIA, F.A.M; PINHEIRO, A.C. Susceptibilidade das raças Corriedale e Crioula Lanada a infecção natural por helmintos gastrintestinais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9., Itapema. **Anais...** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 6, 1997.

BRONDANI, R. P. V.; GRATATAPAGLIA, D. Cost-Effective Method to Synthesize a Fluorescent Internal DNA Standard for Automated Fragment Sizing. **Bio Techniques**, v. 31, p. 793-800, 2001.

BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 3, p. 939-943, 1993.

BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 900-911, 2003.

BUCHANAN, F. C.; GALLAOWAY, S. M.; CRAWFORD A. M. Ovine microsatellites at the OarFCB5, OarFCB19, OarFCB20, OarFCB48, OarFCB129, OarFCB226. **Animal Genetics**, v. 25, p. 60, 1993a.

BUCHANAN, F. C.; LITTLEJOHN, R. P.; GALLAOWAY, S. M.; CRAWFORD A. M. Microsatellites and associated repetitive elements in the sheep genome. **Mammalian Genome**, v. 4, p. 258-264, 1993b.

BUCHANAN F. C.; CRAWFORD A. M. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF214 locus. **Animal Genetics**, v. 23, p. 393-394, 1992.

BUCHANAN F. C.; CRAWFORD A. M. Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. **Animal Genetics**, v. 24, p. 145, 1993.

BUCHANAN F. C.; SWARBRICK, P. A.; CRAWFORD, A. M. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF65 locus. **Animal Genetics**, v. 23, p. 85-85, 1991.

BURFENING, P.; CHAVEZ, C. J. The criollo sheep in Peru. **Animal Genetic Resources Information**, n. 17, p. 123-135, 1996.

CAÑÓN, J.; CORTÉS, O.; GARCIA, D.; GARCIA-TANCE, M. A.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Distribución de la variabilidad genética en la raza de Lidia. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 391-396, 2007.

CHUNG, E. R.; KIM, Y. S.; KIM, G. W.; CHOI, S. H.; HAN, S. K. Identification of breed specific DNA markers in Korean native goats using RAPD and RAPD-SSCP. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 8., Seoul. **Anais...** Seoul, Korea: Seoul National University, 1998.

CINKULOV, M.; TAPIO, M.; OZEROV, M.; KISELYOVA, T.; MARZAMOV, M.; PIHLER, I.; OLSAKER, I.; VEGARA, M.; KANTANEN, J. Genetic differentiation between the Old and New types of Serbian Tsigai sheep. **Genetic Selection Evolution**, v. 40, n. 3, p. 321-331, 2008.

COSTA, A. R. **O Rio Grande do Sul**. Ensino de Agronomia e Veterinária. Porto Alegre: Globo, 1922.

CRAWFORD, A. M.; DODDS, K. G.; EDE, A. J.; PIERSON, C. A. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. **Genetics**, v. 140, p. 703-724, 1995.

DE GORTARI, M. J.; FREKING, B. A.; KAPPES, S. M.; LEYMASTER, K. A.; CRAWFORD, A. M.; STONE, R. T.; BEATTIE, C. W. Extensive genomic conservation

of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. **Animal Genetics**, v. 28, p. 274-290, 1997.

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. **Genome Research**, v. 13, p. 2242-51, 2003.

EGITO, A. A. do. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial**: subsídios para conservação. 279p. 2007. (Tese Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília.

EGITO, A. A. do; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MARIANTE, A. da S; ALMEIDA, L. D. de ; CASTRO, S. T. R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC Genetics**, v. 8, p. 83, 2007.

EGITO, A. A. do; PAIVA, S. R.; MAMANI, E. M.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MCMANUS, C.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. da S; GRATTAPAGLIA, D. Variabilidade genética de raças bovinas baseada em marcadores STR. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, SP: FZEA-USP, 2004.

EXCOFFIER, L.; ARLEQUIN – A software for Population Genetics Data Analysis. Link:anthro.unige.ch/arlequin. E-mail: [arlequin@sc2a.unige.ch](mailto:arlequin@sc2a.unige.ch).2000.

FELSENSTEIN J. **PHYLIP** - (phylogeny inference package) version. 3.5c. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993. 51p.

FELSENSTEIN J. **PHYLIP** - (phylogeny inference package), version 3.6. Seattle (WA): University of Washington, 1995.

FITZHUGH, H. A.; STRAUSS, M. S. Management of global animal genetic resources organization and institutional structure. In: HODGES, J. (Ed.). **The management of global animal genetic resources**. Rome, Italy: FAO, 1992. (FAO Animal Production and Health Paper, 104). Proceedings of an FAO Expert Consultation.

GOMEZ-RAYA, L; PRIEST K.; RAUW, W. M.; OKOMO-ADHIAMBO, M.; THAIN, D.; BRUCE, B.; RINK, A.; TORELL, R.; GRELLMAN, L.; NARAYANAN, R.; BEATTIE, C. W. The value of DNA paternity identification in beef cattle: Examples from Nevada's free-range ranches. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 17-24, 2008.

GOUDET J. **FSTAT Version 2.9.3.2 for windows**: a computer program to calculate F-statistics. 2002. Disponível em: < <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> >. Acesso em: 10/12/2003.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-362, 1992.

GWAKISA P. S. **Genetic diversity in indigenous cattle for East Africa - using RAPDs.** 2002. Disponível em: <  
<http://agtr.ilri.cgiar.org/Casestudy/Gwakisa/genedive.htm>>. Acesso em: 15/01/2008.

HAMADA, H.; PETRINO, M. C.; TAKUGANA, T. A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceeding of National Academy of Sciences, USA**, v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HETZEL, J. Livesock genome research on the march. **Nature Genetics**, v. 4, n. 4, p. 327-28, 1993.

HIENDLEDER, S.; MAINZ, K.; PLANTE, Y.; LEWALSKI, H. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 113-120, 1998.

HOFFMANN, I.; AJMONE MARSAN, P.; BARKER, J. S. F.; COTHRAN, E. G.; HANOTTE, O.; LENSTRA, J. A.; MILAN, D.; WETGEND, S.; SIMIARNER, H. New MoDAD marker sets to be use in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL GENTICS PROCEEDING, 20., 2004, Tokyo, Japan. **Proceedings...** Tokyo, Japan: [s.n.], 2004. Abstract 123.

HUSON D. H.; BRYANT, D. [Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies](#). **Molecular Biology Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

JIA, B; CHEN, J; ZHAO, R. Q.; LUO, Q. J.; YAN, G. Q.; CHEN, J. Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of eight sheep breeds in Xinjiang. **Yi Chuan Xue Bao**, v. 30, n. 9, p. 847-854, 2003.

KANTANEN, J.; OLSAKER, I.; HOLM, L. E.; LEIN, S.; VILKKI, J.; BRUSGAARD, K.; EYTHORSOTTIR, E.; DANELL, B.; ADALSTEINSSON, S. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. **Journal of Heredity**, v. 91, n. 6, p. 446-457, 2000.

KEMP, S. J.; HISHIDA, O.; WAMBUGU, J.; RINK, A.; LONGERI, R. Z. M. A; DA, Y.; LEWIN, H. A.; BARENDSE, W.; TEALE, A. J A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 26, p. 299-306, 1995.

LU, S.; CHANG, H.; DU, L.; TSUNODA, K.; SUN, W.; YANG, Z.; CHANG, G.; JI, D. Phylogenetic relationships of sheep populations from coastal areas in East Asia. **Biochemical Genetics**, v. 6, p. 43251-60, 2005.

LUIKART, G.; CORNUET, J. M.; ALLENDORF, F. W. Temporal changes in allele frequencies provide estimates of population bottleneck size. **Conservation Biology**, v. 89, p. 238-247, 1998.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99, 1994.

MACE, G. M.; SMITH, T. B.; BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. An overview of the Issues. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Ed.). **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford Press University, 1996.

MacHUGH, D. E.; SHRSIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 146, p. 1071-86, 1997.

MADDOX J. F., SCHIBLER L., CRIBIU E. P., KANG N., DAVIES K. P., VAIMAN D. Linkage mapping of goat ChirUCO, LSCV and SR-CRSP microsatellites in sheep. **Animal Genetics**, v. 31, p. 292-293, 2000.

MARIANTE, A. da S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 223-235, 2002.

MARMI, J.; PARÉS, P. M.; JORDANA, J. Análisis genético de la raza ovina aranesa con marcadores microsatélite. **Achivos de Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 435-439, 2007.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L.; PEMBERTON, J. M. Statistical Confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 639-655, 1998.

MARTÍNEZ, A. M.; QUIROZ, J.; DELGADO, J. V.; VEJA-PLA, J. L. Caracterización genética de la oveja canaria con microsatélites de ADN. **Achivos de Zootecnia**, v. 55, n. 216, p. 421-424, 2007a.

MARTÍNEZ, A. M.; QUIROZ, J.; MARQUES, J. R.; DELGADO, J. V. Estudio de la diversidad genética del cerdo negro canario con microsatélites de ADN. **Achivos de Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 425-428, 2007b.

MARTÍNEZ, A. M.; ROCHA, L.; QUIROZ, J.; DELGADO, J. V. Estudio de la diversidad genética intrarracial de la cabra murciano-granadina con microsatélites de ADN. **Achivos de Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 417-420, 2007c.

MEGENS, J-H.; CROOIJMANS, P. M. A. R.; CRISTOBAL, M. S.; HUI, X.; LI, N.; GROENEN, A. M. M. Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication. **Genetics Selection Evolution**, v. 40, p. 103-128, 2008.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple setting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v 16, p.1215, 1988.

MOORE, S. S.; SARGEANT, L. L.; KING, T. J.; MATTICK, J. S.; GEORGES, M.; HETZEL, D. J. S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian

genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, p. 654-660, 1991.

MUÑOZ, C. E. Origen, formación y diferenciación de las razas ovinas. In: MUÑOZ, C. E. **Razas ganaderas españolas: II Ovinos**. [S.l.]: FEAGAS; MAPA, 2003.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, n. 6, p. 283-292, 1972.

OLDENBROEK, J. K. Introdução. In: OLDENBROEK, J.K. (Ed.). **Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources**. Lelytad, NL: DLO Institute for Animal Science and Health, 1999. p. 1-9.

OLLIVIER, L.; FOULLEY, J. L. Aggregate diversity: New approach combining within-and between-breed genetic diversity. **Livestock Production Science**, v. 95, p. 247-254, 2005.

PAIVA, S. R. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**. 108p. 2005. (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PAIVA, S. R.; FARIA, D. A. de; SILVÉRIO, V. C.; PAIXÃO, D. M.; SOLLERO, B. P.; PIMENTEL, C. M. M.; EGITO, A. A. do; DERGAM, J. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MARIANTE, A. da S. Caracterização genética de Ovis aries no Brasil por meio de marcadores microssatélites. In: SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE LA CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RECURSOS ZOOGENÉTICOS, 5., 2004, Puno, Peru. **Anais...** Puno, Peru: Universidad Nacional del Altiplano, 2004a. v. 1. p. 84-86.

PAIVA, S. R.; FARIA, D. A. de; SILVÉRIO, V. C.; SOLLERO, B. P.; PAIXÃO, D. A.; PIMENTEL, C. M. M.; EGITO, A. A. do; DERGAM, J. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MARIANTE, A. da S. Viabilidade de loci microstélites para exclusão de paternidade em raças brasileiras de ovinos. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, SP: FZEA-USP, 2004b.

PAIVA, S. R.; FARIA, D. A. de; SILVÉRIO, V. C.; MCMANUS, C. M.; OLIVEIRA, A. A. de; DERGAM, J. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; PEREIRA, M. S.; EGITO, A. A. do; AZEVEDO, H. C.; LÔBO, R. N. B.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. da S. Aplicação de marcadores moleculares na conservação e melhoramento de um rebanho da raça Santa Inês. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia, GO: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005a.

PAIVA, S. R.; FARIA, D. A. de; SILVÉRIO, V. C.; PIMENTEL, C. M. M.; EGITO, A. A. do; DERGAM, J. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MARIANTE, A. da S. Genetic variability among Brazilian sheep using microsatellites. In: THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY FOR THE CHARACTERIZATION OF CROP, FORESTRY ANIMAL AND FISHERY GENETIC RESOURCES, 2005, Turim. **Proceedings...** Animal Genetics. v. 37, n. 4, p. 195-196, 2005b.

PAIVA, S. R.; FARIA, D. A. de; SILVÉRIO, V. C.; PIMENTEL, C. M. M.; EGITO, A. A. do; DERGAM, J. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; MARIANTE, A. da S. Phylogenetic relationships among Brazilian sheep breeds. In: THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY FOR THE CHARACTERIZATION OF CROP, FORESTRY ANIMAL AND FISHERY GENETIC RESOURCES, 2005, Turim. **Proceedings...** *Animal Genetics*. v. 37, n. 4, p. 197-198, 2005d.

PENTY, J. M.; HENRY, H. M.; EDE, A. J.; CRAWFORD, A. M. Ovine microsatellites at the OarAE16, OarAE54, OarAE57, OarAE119 and OarAE129 loci. **Animal Genetics**, v. 24, p. 219, 1993.

PETER, C.; PRINZENBERG, E. M.; ERHARDT, G.; THE ECONOGENE CONSORTION. Null allele at the OarAE129 locus and corresponding allele frequencies in German sheeps. **Animal Genetics**, v. 36, p. 71-93, 2005.

POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. Genotyping erros: causes, consequences and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 847-859, 2005.

POSTIGLIONI, A.; RINCÓN, G.; KELLY, L. Marcadores moleculares en bovinos del Uruguay. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 193-194, 2007.

ROHLF, M. **NTSYS-pc**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0. Albany, N.Y: Department of Ecology and Evolution. University of New York, 1998.

RONGQING, G.; CHANG, H.; WANG, L.; TSUNODA, K.; YANG, Z.; SUN, W; JI, D.; LI, Y. Genetic differentiation of native sheep populations in East and South Asia. **Biochimical Genetics**, v. 2, p. 3421-32, 2007.

RONGQING, G.; CHANG, H.; WANG, L.; YANG, Z.; SUN, W.; JI, D.; LU, S.; DU, L. Gene flow among sheep breeds of Mongolian group in China. **Yi Chuan**, v. 29, n. 3, p. 324-8, 2007a.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Genetics**, v. 5, p. 63-69, 2004.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin, ver.2.000**: A software for population genetic data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.

SILVA, A. C. M. Caracterização genética de cavalos naturalizados usando marcadores microssatélites. **2006. 61p. (Tese Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.**

SILVA, A. C. M.; PAIVA, S. R.; PIMENTEL, C. M. M.; ALBUQUERQUE, M. do S. M.; EGITO, A. A. do; SANTOS, S. A.; LIMA, F. C.; SERRA, O. R.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. da S. Genetic diversity in naturalized horses breeds in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte. **Proceedings...** Belo Horizonte: Instituto Prociências, 2006. v. único.



SOLLERO, B. P. **Diversidade genética das raças naturalizadas de suínos no Brasil por meio de marcadores microssatélites**. 2006. 87p. (Tese Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SOLLERO, B. P.; PAIVA, S. R.; FARIA, D. A. de; GUIMARÃES, S. E. F.; BERTRANI, G. R.; PIOVEZAN, U.; MAMANI, E. M.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. da S. Genetic diversity in naturalized and commercial pig breeds in Brazil. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte. **Proceedings...** Belo Horizonte: Instituto Prociências, 2006. CD-ROM.

SUN, W.; CHANG, H.; HEN, Z. J.; YANG, Z. P.; GENG, S. X. LU; DU, L.; TSUNODA, K. Genetic differentiation between sheep and goats based on microsatellite DNA. **Asian Australian Journal Animal Science**, v. 17, n. 5, p. 583-587, 2004.

SUN, W.; CHANG, H.; JI, D.; XINJUN, L.; LEI, D.; LU, S.; TSUNODA, K. Analysis on genetic diversity and isolation mechanism by distance of different ecological type sheep breeds in Mongolia sheep group. **Journal Genetic Genomics**, v. 34, n. 11, p. 1001-9, 2007.

TAPIO, M.; TAPIO, I.; GRISLIS, Z.; HOLM, L-E.; JEPPSSON, S.; KANTANEN, J.; MICEIKIENE, I.; OLSAKER, I.; VIINALASS, H.; EYTHORSDDOTTIR, E. Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 13, p. 3951-63, 2005.

TOTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-81, 2000.

VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; EGGEN, A.; CIAMPOLINI, R.; LEPINGLE, A.; VELMALA, R.; KAUKINEN, J.; VARVIO, S. L.; MARTIN, P.; LEVEZIEL, H.; GUERIN, G. Conservation of a syntenic group of microsatellite loci between cattle and sheep. **Mammalian Genome**, v. 5, p. 310-314, 1994.

VANKAN, D. M.; FADDY, M. J. Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple-sire matings. **Animal Genetics**, v. 30, n. 5, p. 355-361, 1999.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKY, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

ZAMORANO, M. J.; RUITER, J.; TOWNSEND, S.; CRUICKSHANK, R.; BRUFORD, M.; BYME, K.; RODERO, A.; VEGA-PLA, J. L. Polimorfismo de DNA en las razas ovinas Merino y Churra Lebrijana. **Archivos de Zootecnia**, v. 47, p. 267-272, 1998.

## **CAPÍTULO III**

### **Divergências e similaridades genéticas entre o ovino crioulo lanado brasileiro – Fronteira, Serrana e Zebua – e a raça *Corriedale***

## 1. INTRODUÇÃO

Como já comentado na Introdução Geral, o conceito de raça em zootecnia é distinto do conceito em biologia. De acordo com a definição da FAO, refere-se a um grupo de gado com características externas definidas ou identificáveis, que se distingue morfológicamente de outros grupos similares da mesma espécie. Pode ser, também, um grupo para o qual houve separação geográfica e/ou cultural de outros fenotipicamente similares. Em ambos os casos, a identidade da raça é aceita, isto é, a raça é reconhecida oficialmente, no caso do Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Os ecótipos podem dar origem a raças zootécnicas, e neste processo podem ser considerados transições, desde que o padrão seja estabelecido pelos criadores e que cruzamentos sejam evitados entre animais de grupos genéticos diferentes.

Os ovinos Crioulos Lanados brasileiros são classificados, com base na morfologia, em quatro ecótipos: Fronteira, Serrana, Zebua e Comum (Vaz, 1999). Os ecótipos mais difundidos entre os criadores são Fronteira e Serrana. O Zebua era encontrado, principalmente, no Estado do Paraná, de onde desapareceu devido a incentivos fiscais para a criação de raças comerciais. Este ecótipo foi introduzido no Estado do Mato Grosso do Sul, para onde foram levados por produtores que migraram para lá, motivados pela expansão da fronteira agrícola e pecuária. O ecótipo Comum, também conhecido como Ordinário, não é encontrado no Rio Grande do Sul há pelo menos quatro décadas (Vaz, 1999). Enquanto que o ecótipo Fronteira, o maior efetivo entre os Crioulos Lanados, foi oficialmente reconhecido como raça em 2001. O Serrana concentra sua criação no nordeste do Rio Grande do Sul e Planalto Catarinense.

O incentivo à criação de raças melhoradas, bem como o cruzamento de ovinos crioulos com estas, reconhecidamente mais produtivas, teve como consequência a diminuição do efetivo populacional do ovino Crioulo Lanado-OCL. Visando prevenir da extinção destes animais, foram somados esforços para formação, pela EMBRAPA, de um rebanho de conservação, o qual é mantido há mais de duas décadas em uma de suas Unidades de Pesquisa, Embrapa Pecuária Sul, na cidade de Bagé/RS, na época Embrapa Ovinos. Para avaliar a diversidade do OCL e a variabilidade atual dos animais do rebanho de conservação, foram utilizados 16 marcadores genéticos autossômicos do tipo microssatélites.

Torna-se relevante avaliar a diversidade genética dos OCL e destes com a *Corriedale*, raça comercial mais difundida entre os criadores de ovinos do sul do Brasil, a

fim de verificar a introgressão gênica desta na raça e ecótipos crioulos. Os resultados visam auxiliar a escolha de animais que devem permanecer no rebanho de conservação e o manejo reprodutivo do mesmo. Adicionalmente, os produtores terão condições de decidir com base em dados moleculares que animais devem criar.

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo geral:**

Avaliar a diferença no perfil genético entre os ecótipos Fronteira, Serrana e Zebua, e destes com a raça *Corriedale*.

### **Objetivos específicos**

1. Estimar as frequências alélicas para nove marcadores microssatélites (OarAE129, ILSTS11, INRA63, INRA35, OarFCB48, ILSTS05, OMHC1, ILSTS87 e SRCRSP05) nos ecótipos de OCL – Serrana e Zebua, na raça Fronteira e na raça *Corriedale*; verificar se as populações estão em equilíbrio de acordo com o proposto por Hardy-Weinberg;
2. Estimar a heterozigose observada e esperada e o conteúdo de informação de polimorfismo (*PIC*) para cada marcador analisado;
3. Utilizar os dados obtidos para comparações e estimativas de:
  - a. AMOVA, índice de estruturação populacional (*F<sub>ST</sub>*) e o teste de significância do mesmo para comparar os ovinos crioulos e esses com a raça *Corriedale*;
  - b. Diversidade gênica intrapopulacional (Nei, 1972), para cada loco e para os ovinos crioulos e *Corriedale*;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem e análises laboratoriais

Foram incluídos nas análises deste capítulo 102 animais do ecótipo Fronteira (OCLF), 53 do Serrana (OCLS), 39 do Zebua (OZ) e 22 de *Corriedale* (OC). As amostras de sangue dos animais do ecótipo Zebua foram coletadas em propriedades particulares situadas no Pantanal Mato-Grossense e enviadas por correio para processamento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília. A metodologia de extração do DNA foi descrita no Capítulo 2. As análises laboratoriais, também descritas no Capítulo 2, incluíram neste capítulo nove marcadores: OarAE129, ILSTS11, INRA63, INRA35, OarFCB48, ILSTS05, OMHC1, ILSTS87 e SRCRSP05.

#### 3.2 Análise estatística

Para a caracterização de cada raça e ecótipos foram estimadas as frequências gênicas, heterozigose esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) e a probabilidade de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p$ ) utilizando o programa Arlequin 3.0 (Schneider *et al.*, 2000). As diversidades alélicas por loco e por população foram obtidas por contagem manual. O conteúdo de informação polimórfica ( $PIC$ ) por loco foi estimado usando o programa Cervus (Marshall *et al.*, 1998).

A verificação de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p$ ) foi realizada considerando um  $\alpha$  de 5%. Quando as populações apresentaram desequilíbrio para algum marcador, a correção de Bonferroni foi empregada com valor de  $\alpha$  menor (0,003; 0,05/16). O índice de endogamia,  $F_{IS}$ , e seu  $p$ -valor foram estimados, utilizando o software FSTAT (Goudet, 2002).

As frequências alélicas encontradas para as populações foram utilizadas para gerar matrizes de distância, utilizando a distância genética de Nei (1972), construídas pelo programa GENDIST do pacote PHILIP (Felsenstein, 1993). A fim de simplificar a interpretação das distâncias obtidas entre todas as populações, as matrizes de distância foram utilizadas para a construção de gráficos de coordenada principal pelo programa NTSYS (Rohlf, 1998). A análise de componentes principais ( $PCA$ ) e outras dela derivadas, como a análise de coordenada principal ( $PCO$ ), são formas de simplificação de dados multivariados.

A estrutura das populações entre e dentro dos ecótipos foi avaliada pela AMOVA e pela estrutura obtida com o software *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000). A AMOVA foi utilizada para quantificar o quanto da variação observada foi devido à variação inter e intra ecótipos e destes com a raça *Corriedale*, a partir de valores de  $F_{ST}$ . A diversidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ) e a Análise de Variância Molecular foram estimadas utilizando o programa Arlequin 3.0 (Schneider *et al.*, 2000).

A partir do software *Structure* foi inferido o número mais provável de populações em que os genótipos analisados poderiam ser divididos. Este software estima a probabilidade de um dado genótipo pertencer a uma determinada população e assume que as populações analisadas estejam em EHW. Os alelos, para cada loco, são amostrados para cada indivíduo de acordo com a proporção do seu genótipo em uma dada população. O software *Structure* usa o método de cadeia de Markov e simulações de Monte Carlo (Guo & Thompson, 1992) para estimar as permutações que irão gerar a distribuição de probabilidade para cada parâmetro analisado.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliações genéticas de raças de animais zootécnicos vêm sendo conduzidas com o objetivo de buscar métodos para alocação racial, assim como também para detecção de introgressão e mestiçagem (Paiva, 2005; Egito, 2007). No presente trabalho três tipos morfológicos distintos do ovino crioulo lanado brasileiro foram comparados para verificar se a classificação em ecótipos que se baseia em características morfológicas, em geral de herança poligênica multifatorial, reflete diferenças genéticas entre eles.

Na Tabela 3.1 estão apresentadas as frequências alélicas e o teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg estimados para as populações analisadas com nove marcadores do tipo microsatélites autossômicos, para a raça Fronteira, dois ecótipos de ovino crioulo lanado e comparação com a raça *Corriedale*. São apresentados também parâmetros de variabilidade genética, incluindo heterozigose observada e esperada por loco e média, número de alelos (máximo e médio) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

Os nove locos analisados apresentaram polimorfismo em todas as populações e média global de alelos de 7,25 ( $\pm 2,364$ ). O loco OarFCB48 apresentou a maior média de número de alelos (9,50) e o OarAE129, a menor (3,75). A raça Fronteira apresentou a maior média de alelos por loco (8,67) e *Corriedale* a menor (6,11), seguido pelo ecótipo Zebua (6,44) (Tabela 3.1).

Para a maioria dos locos os valores de heterozigose observada ( $H_o$ ) foram menores que a heterozigose esperada ( $H_e$ ), o que sugere excesso de homocigotos nas populações analisadas. O menor valor de  $H_o$  foi 0,35 para OarAE129, em Zebua, e o maior 0,8571 para ILSTS87, em *Corriedale*. O menor valor de PIC foi observado para o marcador OarAE129 em Zebua (0,305), e o maior para OarFCB48 em Fronteira (0,845) (Tabela 3.1).

Um parâmetro de similaridade/diferença entre as populações é a proporção de alelos compartilhados. Para os marcadores STRs analisados, a raça Fronteira e o ecótipo Serrana compartilharam 11,11% dos alelos, percentual igual ao observado quando foram comparados à raça *Corriedale*. A inclusão do ecótipo Zebua aumentou o percentual de alelos compartilhados com *Corriedale* para 42,22%. Este percentual diminuiu consideravelmente quando foram comparadas as crioulas entre si (7,78%) e, também, Fronteira e Serrana com *Corriedale* (11,11%) (Tabela 3.2).

A aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), considerando um  $\alpha$  de 5% foi observado em apenas um loco, o ILSTS11, para todas as populações. Apresentaram



equilíbrio, em pelo menos uma das populações: INRA63, INRA35, OarFCB48 e ILSTS87 e fora do equilíbrio em pelo menos duas: INRA63, OarFCB48, ILSTS87. As populações que apresentaram maior número de locos fora do equilíbrio foram *Corriedale* (sete locos) e Fronteira (seis locos), seguida por Serrana (cinco locos) e Zebua com menor número de locos fora do equilíbrio (4 locos). Após a correção de Bonferroni, para um valor de  $\alpha$  igual a 0,003, três locos continuaram fora do equilíbrio para todas as populações: OarAE129, INRA35 e SRCRSP05; e ainda, INRA63, INRA35 e SRCRSP05, no ecótipo Zebua; OarAE129, INRA35, ILSTS87, SRCRSP05, no ecótipo Serrana e; OarAE129, INRA35, INRA63, OarFCB48, ILSTS87 e SRCRSP05, na raça Fronteira. Os locos INRA63, OarFCB48 apresentaram equilíbrio, após Bonferroni, apenas na população Serrana.

O maior valor de  $F_{IS}$  foi observado na raça *Corriedale* (0,346) e o menor na raça Fronteira (0,150). Os valores estimados de  $F_{IS}$  mostram que há endogamia em todas as populações ( $p < 0,05$ ). Isso significa que os ovinos crioulos lanados e a raça *Corriedale* apresentam excesso de homozigoto, ou seja, consangüinidade (Tabela 3.3).

Tabela 3.1 Frequências alélicas, número de alelos (máximo e médio), tamanho amostral por marcador (N) e médio, heterozigose observada por loco (Ho) e média (Ho média) e esperada por loco (He) e média (He média), valor de p para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) com relação a nove marcadores do tipo microssatélites autossômicos em três ecótipos de ovino crioulo lanado em comparação com a raça comercial *Corriedale*.

<b>Locos/População OARAE129</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b><i>Corriedale</i></b>
<b>N total alelos = 05</b>				
<b>N médio alelos = 3,750 (±1,258)</b>	4	5	2	4
<b>Alelos</b>				
02	0,260	0,226	-	0,100
03	-	0,065	-	-
08	0,213	0,274	0,750	0,433
09	0,500	0,403	0,250	0,400
10	0,027	0,032	-	0,067
<b>N</b>	75	31	18	15
<b>Ho</b>	0,453	0,355	0,167	0,267
<b>He</b>	0,640	0,718	0,386	0,660
<b>p-valor</b>	0,00032 (±0,00005)	0,00005 (±0,00002)	0,03145 (±0,00052)	0,00243 (±0,00015)
<b>PIC</b>	0,573	0,654	0,305	0,568
<b>ILSTS11</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b><i>Corriedale</i></b>
<b>N total alelos = 05</b>				
<b>N médio alelos = 5,500 (±0,577)</b>	6	6	5	5
<b>Alelos</b>				
01	0,231	0,278	0,232	0,222
03	-	-	-	0,028
04	0,167	0,037	0,207	0,167
05	0,045	0,093	-	-
06	0,096	0,111	0,183	0,222
07	0,051	0,167	0,024	-
08	0,410	0,315	0,354	0,361
<b>N</b>	78	27	41	18
<b>Ho</b>	0,705	0,741	0,683	0,667
<b>He</b>	0,742	0,788	0,753	0,763
<b>p-valor</b>	0,32445 (±0,00005)	0,47225 (±0,00151)	0,15864 (±0,00094)	0,21926 (±0,00122)
<b>PIC</b>	0,700	0,739	0,700	0,699
<b>INRA63</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b><i>Corriedale</i></b>
<b>N total alelos = 05</b>				
<b>N médio alelos = 8,750 (±2.630)</b>	11	9	10	5
<b>Alelos</b>				
01	-	-	0,061	-
02	0,091	0,239	0,439	-

03	-	-	0,030	-
04	0,005	0,022	-	0,045
05	0,565	0,402	0,091	0,773
06	0,124	0,022	0,045	0,114
07	-	-	-	0,045
08	0,005	-	0,015	-
09	0,091	0,130	0,121	-
11	0,038	0,011	0,091	-
12	0,059	0,022	0,045	0,023
14	-	-	0,061	-
15	0,005	0,011	-	-
16	0,011	0,141	-	-
17	0,005	-	-	-
N	93	46	33	22
Ho	0,581	0,761	0,667	0,045
He	0,640	0,751	0,775	0,394
p-valor	0,01669 (±0,00021)	0,50119 (±0,00088)	0,00797 (±0,00024)	0,00000 (±0,00000)
PIC	0,620	0,706	0,745	0,364
<b>INRA35</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b>Corriedale</b>
N total alelos = 05				
N médio alelos = 8,750 (±2,754)	12	10	7	6
<b>Alelos</b>				
01	0,005	-	-	-
02	0,068	0,047	-	-
03	0,079	0,066	0,039	0,045
07	0,032	0,104	-	0,136
08	0,026	0,132	0,224	0,295
09	-	-	0,039	-
10	0,037	0,009	0,013	0,023
11	0,153	0,189	0,105	-
12	0,237	0,264	0,447	0,250
13	0,147	0,142	0,132	0,250
14	0,058	0,028	-	-
15	0,011	-	-	-
16	0,147	0,019	-	-
N	95	53	38	22
Ho	0,768	0,736	0,711	0,636
He	0,864	0,847	0,728	0,784
p-valor	0,00000 (±0,00000)	0,00000 (±0,00000)	0,00397 (±0,00017)	0,07691 (±0,00081)
PIC	0,845	0,820	0,682	0,728
<b>OARFCB48</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b>Corriedale</b>
N total alelos = 05				
N médio alelos = 9,500 (±2,380)	12	11	7	8
<b>Alelos</b>				
02	0,060	0,087	-	0,023
03	0,060	0,077	0,146	0,045

04	0,260	0,346	0,012	0,295
05	0,155	0,183	0,305	0,273
06	0,135	0,067	0,329	0,114
07	-	0,010	0,085	-
08	0,025	0,077	0,061	0,091
09	0,050	0,019	-	-
12	0,060	0,067	-	-
13	0,070	-	0,061	-
14	0,015	-	-	-
17	0,025	0,019	-	0,068
19	0,085	0,048	-	0,091
N	100	52	41	22
Ho	0,780	0,712	0,683	0,591
He	0,868	0,823	0,772	0,820
p-valor	0,00476 (±0,00016)	0,15887 (±0,00077)	0,02778 (±0,00047)	0,00000 (±0,00000)
PIC	0,850	0,797	0,727	0,776
<b>ILSTS05</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b>Corriedale</b>
N total alelos = 05				
N médio alelos = 6,250 (±1,258)	8	6	6	5
<b>Alelos</b>				
01	0,006	-	-	-
02	0,061	0,011	0,200	0,024
03	0,006	-	-	0,024
04	0,017	0,148	0,043	-
05	0,044	-	-	-
06	0,494	0,455	0,457	0,452
07	0,122	0,205	0,029	0,286
08	-	0,034	0,029	-
09	0,250	0,148	0,243	0,214
N	90	44	35	21
Ho	0,589	0,614	0,429	0,857
He	0,676	0,715	0,699	0,683
p-valor	0,06125 (±0,00082)	0,02418 (±0,00035)	0,00607 (±0,00022)	0,69386 (±0,00124)
PIC	0,628	0,666	0,640	0,606
<b>OMHC1</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b>Corriedale</b>
N total alelos = 05				
N médio alelos = 9,000 (±0,816)	9	10	9	8
<b>Alelos</b>				
02	0,028	0,043	-	0,088
05	-	0,033	0,014	-
06	0,022	0,011	0,108	0,088
07	0,006	0,250	-	-
08	0,189	0,120	0,162	0,118
09	0,278	0,370	0,311	0,206
10	0,211	0,087	0,149	0,029
11	0,150	0,033	0,122	0,235

12	0,094	0,011	0,027	0,088
13	0,022	0,043	0,095	0,147
15	-	-	0,014	-
N	90	46	37	17
Ho	0,744	0,826	0,811	0,471
He	0,814	0,781	0,830	0,868
p-valor	0,26256 (±0,00108)	0,21682 (±0,00078)	0,16182 (±0,00089)	0,00086 (±0,00009)
PIC	0,828	0,744	0,797	0,824
<b>ILSTS87</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b>Corriedale</b>
N total alelos = 05				
N médio alelos = 8,750 (±1,500)	11	8	8	8
<b>Alelos</b>				
01	0,041	0,106	-	0,136
02	0,014	0,015	-	-
03	0,212	0,379	0,079	0,182
04	0,226	-	0,079	-
05	0,034	0,045	0,026	0,182
06	0,027	-	0,132	0,136
07	0,034	0,015	0,026	0,045
08	0,171	0,076	0,342	0,227
09	0,089	0,106	-	0,045
10	0,110	0,258	0,263	-
11	0,041	-	0,053	0,045
N	73	33	19	11
Ho	0,644	0,424	0,842	0,455
He	0,854	0,771	0,801	0,879
p-valor	0,00000 (±0,00000)	0,00000 (±0,00000)	0,90368 (±0,00087)	0,00476 (±0,00017)
PIC	0,831	0,727	0,750	0,818
<b>SRCRSP05</b>	<b>Fronteira</b>	<b>Serrana</b>	<b>Zebua</b>	<b>Corriedale</b>
N total alelos = 05				
N médio alelos = 5,000 (± 0,816)	5	5	4	6
<b>Alelos</b>				
01	-	-	-	0,050
02	0,064	0,083	0,032	0,125
03	0,346	0,313	0,274	0,475
04	0,074	0,167	0,032	0,050
05	0,505	0,427	0,661	0,250
06	0,011	0,010	-	0,050
N alelos = 06				
N	94	48	31	20
Ho	0,457	0,375	0,097	0,350
He	0,619	0,692	0,493	0,706
p-valor	0,00008 (±0,00003)	0,00000 (±0,00000)	0,00000 (±0,00000)	0,00006 (±0,00002)
PIC	0,547	0,630	0,418	0,647

<b>N<sup>0</sup> médio de cópias gênicas</b>	175,111 (±19,419)	84,444 (±18,968)	65,111 (±17,266)	37,333 (±7,616)
<b>N<sup>0</sup> médio de alelos</b>	8,667 (±3,082)	7,778 (±2,333)	6,444 (±2,506)	6,111 (±1,537)
<b>Ho (média)</b>	0,63579 (±0,12520)	0,61587 (±0,18277)	0,56533 (±0,27227)	0,48204 (±0,24129)
<b>He (média)</b>	0,74707 (±0,10426)	0,76508 (±0,05141)	0,69288 (±0,15098)	0,72871 (±0,14741)

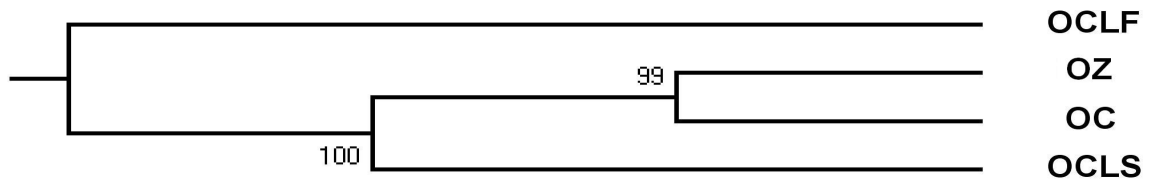
**Tabela 3.2** Alelos compartilhados, por loco, entre ovinos crioulos lanados e a raça *Corriedale*. OCLF (ovino crioulo lanado Fronteira), OCLS (ovino crioulo lanado Serrana), OZ (ovino crioulo lanado Zebua) e OC (ovino *Corriedale*).

Populações Locos	OCLF x OCLS	OCLF x OCLS x OZ	OCLF x OCLS x OC	OCLF x OCLS x OZ x OC	OCLF x OZ	OCLS x OZ
	<b>OarAE129</b>	-	-	2	8 e 9	
<b>ILSTS11</b>	5	7	-	1, 4, 6 e 8		
<b>INRA63</b>	15 e 16	2, 9 e 11	4	5, 6 e 12		
<b>INRA35</b>	2, 14 e 16	11	7	3, 8, 10, 12 e 13		
<b>OarFCB48</b>	9 e 12	-	2, 17 e 19	3, 4, 5, 6 e 8	13	7
<b>ILSTS05</b>	-	4	-	2, 6, 7 e 9		8
<b>OMHC1</b>	7	-	2	6, 8, 9, 10, 11, 12 e 13		5
<b>ILSTS87</b>	2	10	1 e 9	3, 5, 7 e 8	4	
<b>SRCRSP05</b>	-	-	6	2, 3, 4 e 5		
<b>% total</b>	11,11	7,78	11,11	42,22	2,22	3,33

**Tabela 3.3** Valores de  $F_{IS}$  por marcador genético e respectivo p valor para as populações de ovinos crioulos lanados e da raça *Corriedale*. Menor e maior valor de  $F_{IS}$  em negrito.

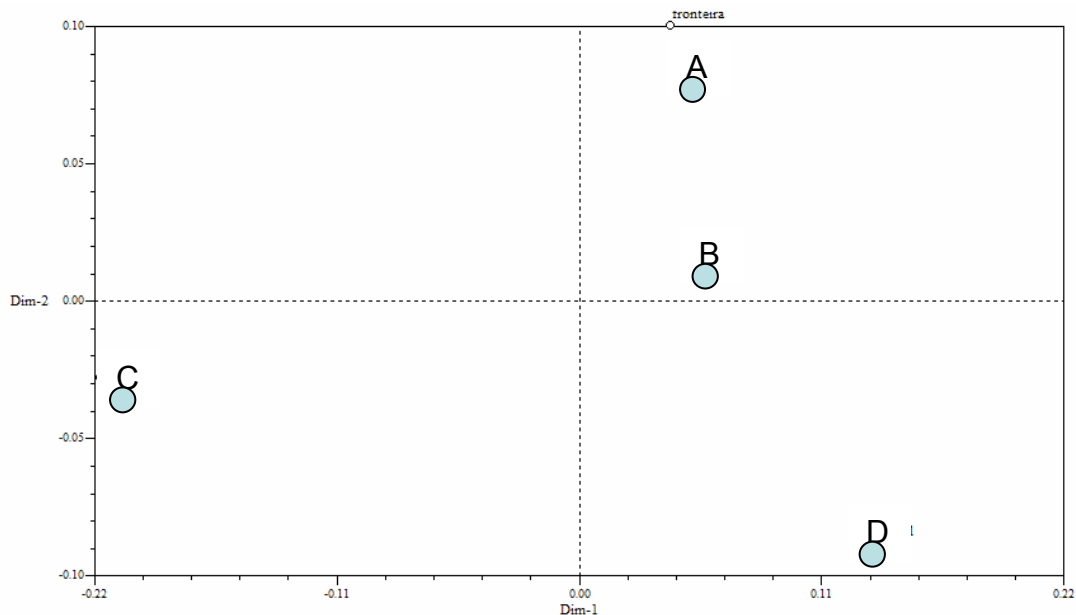
Populações Marcadores	Fronteira		Serrana		Zebua		<i>Corriedale</i>	
	Fis	p	Fis	p	Fis	p	Fis	p
OARAE1	0,294	0,0004	0,510	0,0000	0,575	0,0333	0,604	0,0010
ILSTS1	0,049	0,2511	0,061	0,3375	0,095	0,1864	0,130	0,2341
INRA63	0,104	0,0420	-0,014	0,6368	0,141	0,0565	0,887	0,0000
INRA35	0,111	0,0056	0,132	0,0205	0,024	0,4637	0,192	0,0771
OARFCB	0,101	0,0066	0,137	0,0182	0,116	0,1080	0,284	0,0068
ILSTS0	0,129	0,0284	0,143	0,0703	0,390	0,0002	-0,263	0,9877
OMHC1	0,086	0,0576	-0,058	0,8501	0,023	0,4465	0,466	0,0001
ILSTS8	0,247	0,0000	0,454	0,0000	-0,053	0,7864	0,495	0,0005
SRCRSP	0,262	0,0004	0,461	0,0000	0,806	0,0000	0,511	0,0002
<b>Total</b>	<b>0,150</b>	0,0000	0,197	0,0000	0,187	0,0000	<b>0,346</b>	0,0000

A árvore de relacionamento do tipo *Neighbor joining*, obtida utilizando a matriz de distância genética de Nei (1972), está apresentada na Figura 3.1. Pode-se observar que todos os valores de *bootstrap* são altos. O dendrograma indica que o ecótipo mais diferenciado foi o Fronteira, que se encontra em um ramo à parte das demais populações. Observa-se também um agrupamento formado por Zebua e *Corriedale* sugerindo maior similaridade entre estes.



**Figura 3.1** Dendrograma obtido a partir da distância genética de Nei (1972), com a análise de nove marcadores microssatélites autossômicos, mostrando a relação entre ovinos crioulos lanados brasileiros e a raça *Corriedale*.

O diagrama de coordenadas principais, a partir de nove locos, mostrou que 75,08% da variabilidade entre as populações foram representados na primeira coordenada e 20,97% na segunda. Fronteira e Serrana ficaram posicionadas no mesmo quadrante, o que reflete que houve maior similaridade entre estes. Zebua ficou posicionado em um quadrante isolado dos demais, assim como *Corriedale* (Figura 3.2)



**Figura 3.2** Diagrama das duas primeiras coordenadas principais mostrando o relacionamento entre os OCL e raça *Corriedale*. A– Fronteira; B– Serrana; C– Zebua e D– *Corriedale*.

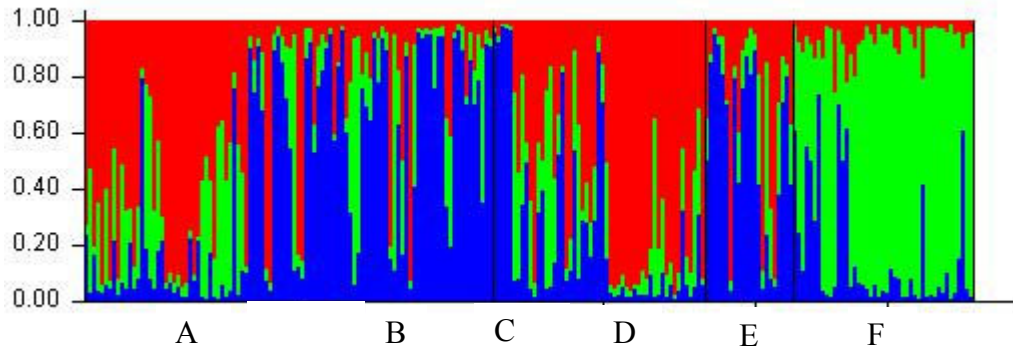


O programa Structure realiza uma avaliação individual. Por esse motivo, é possível diferenciar as duas sub-populações que compõe as populações Fronteira e a Serrana, população do rebanho de conservação e de particulares. Nas Figuras 3.3 e 3.4 estão representados 222 animais das quatro populações (OCL Fronteira, OCL Serrana, O*Corriedale* e OZebua) analisadas pelo programa Structure. Cada um dos animais é representado por uma linha vertical dividida em segmentos, classificado pela cor e tamanho correspondente à proporção relativa do seu genoma e de acordo com um agrupamento. As populações foram separadas por linhas pretas verticais em: raça Fronteira (inclui a população de fora, na primeira metade, e a do rebanho de conservação, na segunda metade; nesta ordem); ecótipo Serrana (inclui a população do rebanho de conservação e a de fora; nesta ordem); raça *Corriedale* e o ecótipo Zebua. As populações Fronteira e Serrana de fora do rebanho foram representadas, em sua maioria, pela cor vermelha enquanto que as do rebanho de conservação em azul, semelhante à *Corriedale*. O ecótipo Zebua foi representado pela cor verde (Figura 4.3).

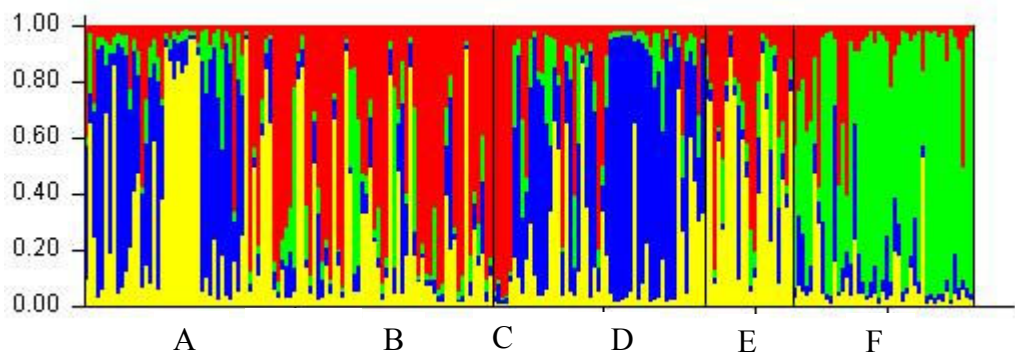
A composição obtida com K igual a três (três grupos parentais) (Figura 3.3) sugeriu que as populações estão bastante miscigenadas com a raça *Corriedale*, representada pela cor azul. A primeira metade da população 1 corresponde aos animais de fora do rebanho de conservação, seguido na segunda metade pelos animais do rebanho. A diferença entre a primeira e a segunda metade da população 1 sugeriu que o rebanho de conservação recebeu maior introgressão de *Corriedale*. As populações Fronteira e Serrana de fora do rebanho apresentaram menor introgressão, embora tenham sido observados alguns animais com introgressão maior. O ecótipo Zebua apresentou composição genética distinta dos demais ecótipos, com menos introgressão de *Corriedale*.

Quando foi assumido o valor de K igual a quatro (Figura 3.4), foram observadas áreas comuns às populações, o que pode indicar similaridade ou ancestrais em comum. A população Fronteira do rebanho de conservação foi a mais similar à raça *Corriedale*. Por outro lado, a de fora do rebanho apresentou alguns animais com similaridade maior com *Corriedale*, enquanto que em outros a similaridade foi maior com o ecótipo Serrana de fora do rebanho; ou seja, a população Fronteira de fora do rebanho mostrou-se miscigenada com Serrana de fora do rebanho, e também com *Corriedale*. Da mesma forma, animais Serrana do rebanho de conservação, representados por cinco animais não aparentados, foram similares aos Fronteira do rebanho. Pode-se visualizar padrões complexos de miscigenação entre as populações Fronteira, Serrana e *Corriedale*; novamente Zebua manteve-se como a população mais dissimilar em relação às outras. Nas duas figuras pode ser observado que a

população Fronteira do rebanho de conservação é a mais miscigenada com a raça *Corriedale*.



**Figura 3.3** Análise do Structure considerando  $K = 3$ . A– Fronteira; B– Fronteira Rebanho; C– Serrana Rebanho; D– Serrana; E– *Corriedale*; F– Zebua.



**Figura 3.4** Análise do Structure considerando  $K = 4$ . A– Fronteira; B– Fronteira Rebanho; C– Serrana Rebanho; D– Serrana; E– *Corriedale*; F– Zebua.

## 5. CONCLUSÕES

✓De acordo com os dados apresentados, há diferença significativa entre a raça Fronteira e os dois ecótipos do ovino Crioulo Lanado analisados, Serrana e Zebua.

✓A população Fronteira do rebanho foi a mais miscigenada com a raça *Corriedale*. Em todas as análises o ecótipo Zebua foi o mais dissimilar entre os crioulos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EGITO, A. A. do. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para conservação.** 279p. 2007. (Tese Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília.

FELSENSTEIN J. **PHYLIP** - (phylogeny inference package) version. 3.5c. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993. 51p.

GOUDET J. **FSTAT Version 2.9.3.2 for windows:** a computer program to calculate F-statistics. 2002. Disponível em: < <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> >. Acesso em: 10/12/2003.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-362, 1992.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, n. 6, p. 283-292, 1972.

PAIVA, S. R. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares.** 108p. 2005. (Tese Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. J. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

ROHLF, M. **NTSYS-pc.** Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0. Albany, N.Y: Department of Ecology and Evolution. University of New York, 1998.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin, ver.2.000:** A software for population genetic data analysis. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.

VAZ, C. M. S. L.; SELAIVE-VILLAROEL, A. B.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. S. Distribuição geográfica da ovelha crioula lanada no Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ESPECIALISTAS EN PEQUEÑOS RUMINANTES Y CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS; ENCONTRO DE MEDICINA DE PEQUEÑOS RUMINANTES DO CONE SUL, 2.; JORNADAS URUGAIAS DE OVINOS, 11. , 1999, Montevideu. **Proceedings...** Montevideu: AVEPER, 1999.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de RAPD detectou diferença genética estatisticamente significativa entre os seis grupos da raça Fronteira e o gupo do ecótipo Serrana que compõem o rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul, evidenciando subestruturação;

Para uma melhor representatividade da raça Fronteira e do ecótipo Serrana no rebanho de conservação da Embrapa Pecuária Sul sugerimos que sejam incentivados programas de introgressão de alelos ausentes no referido rebanho;

Sugere-se, também, que seja formado um rebanho de conservação do ecótipo Zebua, o qual ocorre em área geográfica distinta da que era encontrado há vários anos atrás e mostrou-se geneticamente dissimilar de Fronteira e Serrana;

Similarmente à raça Fronteira, deverão ser somados esforços para que a criação de animais dos ecótipos Serrana e Zebua seja incentivada e que estes possam ser, futuramente, reconhecidos como raça; especialmente o Zebua, o mais dissimilar entre os crioulos.

## ANEXO 1

EXTRAÇÃO DE DNA DE LEUCÓCITOS (adaptada de Miller *et. al.*, 1988)

1. Em tubos Falcon de 15 ml, utilizar 13 ml do tampão para lise de hecáceas (*blood lysis buffer*) 1x com o *pellet* de leucócitos da amostra a ser extraído o DNA; homogeneizar e colocar em gelo picado por 30 minutos, a fim de lisar as hemácias aderidas;
2. Após este período, centrifugar por 10 minutos a 2.500 rpm e descartar o sobrenadante (repetir esta etapa até o sedimento, *pellet*, ficar isento de hemácias);
3. Ressuspender o *pellet* em 5 ml do tampão para lise do núcleo (*nucleus lysis buffer*) 1x e levar ao agitador (*vórtex*);
4. Adicionar 35 µl de proteinase K (20 mg/ml) e misturar cuidadosamente. Em seguida, adicionar 500 µl de SDS 10%, misturar cuidadosamente e incubar por uma noite a 56 °C. A solução deverá estar clara e viscosa pela manhã;
5. Adicionar 1,67 ml de NaCl saturado (6M), misturar vagarosamente por 15 segundos e centrifugar por 20 minutos a 3.000 rpm;
6. Transferir o sobrenadante para outro tubo tipo Falcon e centrifugar novamente por 20 minutos a 3.000 rpm;
7. Transferir o sobrenadante para outro tubo Falcon e precipitar o DNA adicionando etanol absoluto, à temperatura ambiente, duas vezes o volume;
8. Verter vagarosamente o tubo e pescar o DNA enovelado depositando-o em tubo *eppendorf* com 1 a 1,5 ml de etanol a 70% (temperatura ambiente), centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm;
9. Retirar o etanol e deixar o DNA secar à temperatura ambiente. Após seco, dissolver o DNA em TE 10;1 (pH 7,6) em volume estimado para o tamanho do enovelado extraído, em torno de 1 a 1,5 ml;
10. Encubar a 65 °C por 15 a 30 minutos para evitar contaminação por DNase e deixar uma noite a 37 °C no homogeneizador (*mixer*), para diluição do DNA de forma homogênea na solução.
11. Guardar as amostras a 4 °C até a quantificação, e depois de quantificado guardar a -20 °C.