

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

DAYANA RANGEL FALCÃO ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS DA RAÇA SANTA
INÊS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES

Campos dos Goytacazes
Julho de 2013

DAYANA RANGEL FALCÃO ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS DA RAÇA SANTA
INÊS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

ORIENTADORA: Professora Celia Raquel Quirino

Campos dos Goytacazes
Julho de 2013

DAYANA RANGEL FALCÃO ALMEIDA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS DA RAÇA SANTA
INÊS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 19 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Renato Travassos Beltrame – UNESC

Dra. Aline Pacheco - UENF

Dra. Aparecida de Fátima Madella de Oliveira - IFES

Professora Celia Raquel Quirino (Pós-Doutora, Genética e Melhoramento) – UENF

AGRADECIMENTOS

À Deus e aos amigos e mentores espirituais que sempre estiveram ao meu lado, inspirando e acalmando nos momentos de aflição.

À minha família que me deu base de tudo que sou hoje. Em especial à minha mãe que mesmo em meio a tantas dificuldades e preconceitos me criou sem um pai, e sempre me estendeu as mãos em momentos difíceis, não me deixando desistir em momento algum. Em *memorian* à minha avó que colaborou muito com minha educação desde criança e tornou-se minha segunda mãe desde então, estando ao meu lado me incentivando a cada passo, mesmo quando muito doente abrindo mão do acompanhamento da minha mãe no hospital enquanto agíamos os últimos detalhes para meu início efetivo ao mestrado. À minha tia de criação Maria da Conceição que também ajudou muito na minha criação, pessoa que considero até hoje minha terceira mãe. Ao meu avô Augusto César que fez muito por mim e por minha mãe. À minha irmã Myllena que também demonstrou grande amizade e companheirismo.

Ao meu companheiro Fernando Felipe Duarte, a quem conheci quando menos esperava e nesses anos se mostrou uma pessoa especial, estando ao meu lado desde o início, dando apoio, coragem e incentivo para o ingresso na pós-graduação e dando suporte em momentos pessoais e profissionais difíceis, os quais eu mais precisei.

À minha orientadora professora Celia Raquel Quirino, que me acolheu desde a graduação, agradeço à oportunidade, paciência, dedicação e boa vontade dispensada.

Ao Técnico e amigo do LRMGA Thiago Corrêa pelo companheirismo, colaboração e paciência, a quem devo tudo que aprendi no laboratório de molecular.

À Aline Pacheco, que sempre auxiliou e se dispôs a sanar qualquer dúvida, contribuindo também com sugestões para a apresentação do trabalho.

À professora Aparecida de Fátima Madella, que disponibilizou amostras de alguns dos rebanhos, à nova amizade que surgiu quando pude conhecê-la melhor e ainda ao apoio em alguns momentos de tensão, principalmente no Simpósio Iberoamericano.

Ao professor Renato Travassos Beltrame que concedeu amostras e apoio material, acolhendo o projeto.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

À equipe do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Animal: Thiago, Amanda, Wilder, Júnior, Mariana, Dévanny, Miguel, principalmente à ajuda do Júnior na coleta de algumas amostras, Amanda, Thiago e Wilder que souberam ser também bons amigos, apoiar e ajudar em momentos difíceis.

À toda a equipe do Laboratório de Melhoramento Vegetal da UENF: professor Medina, Pedro, Helaine, Marcela e Vitória pela disposição, ajuda e por tirar minhas dúvidas quando precisei.

*O ruim é que a ciência ganha em
conhecimento mais do que a sociedade
ganha em sabedoria
(Isaac Asimov)*

RESUMO

Com o constante crescimento da ovinocultura no Brasil, faz-se necessário a realização de trabalhos de caracterização e conservação de recursos genéticos de animais naturalizados para identificar e manter características genéticas importantes para manutenção da raça. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de ovinos da raça Santa Inês no estado do Espírito Santo, visando à identificação de indivíduos aparentados e não aparentados dentro e entre rebanhos. Foram utilizados 120 animais, 20 de cada rebanho e 7 marcadores microsatélites. O DNA foi extraído dos bulbos contidos na raiz dos pelos, realizada a PCR e corrida em eletroforese capilar. A análise estatística foi feita com o software PowerMarker V2.5. Todos os *loci* analisados apresentaram-se polimórficos, verificando-se de 3 a 10 alelos. A média da heterozigosidade observada foi 0,2713 e da heterozigosidade esperada foi de 0,6454. Em todos os rebanhos o *locus* OarFCB011 foi o mais polimórfico, com um total de 10 alelos. Verificou-se baixa diversidade entre e dentro dos rebanhos, com perda de alelos e conseqüentemente diminuição da variabilidade genética.

Palavras chave: Conservação, endogamia, marcadores moleculares, recursos genéticos, variabilidade genética.

ABSTRACT

With the continuous growth of sheep husbandry in Brasil, the realization of works of characterization and conservation of genetic resources of naturalised animals is necessary for identifying and maintaining important genetic characteristics for the maintenance of the race. The present works objective is to evaluate the genetic diversity of sheep belonging to the Santa Inês breed in the central and southern parts of the State of Espírito Santo, aiming at identifying related and unrelated individuals in and between flocks. 120 animals were used, 20 of each breed and 7 microsatellites' markers. The DNA was extracted of the bulbs contained in the root of the hair, a PCR was realized and race in capillary electrophoresis. The statistical analysis was done with the software PowerMarker V2.5. All the analised *loci* presented themselves as polymorphic, verifying 3 to 10 alleles. The average of the observed heterozygosity was 0,2713 and the average of the expected heterozygosity was 0,6454. In all the flocks the *locus* OarFCB011 was the most polymorphic with a total of 10 alleles. A low diversity in and between flocks was verified with a loss of the alleles and a consequent decrease in the genetic variability.

Keywords: Conservation, endogamy, molecular markers, genetic resources, genetic variability.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 <i>Loci</i> analisados, temperaturas de anelamento utilizadas, sequência de cada primer, tamanho do fragmento esperado, cromossomo onde ele se localiza em <i>Ovis aries</i> | 20 |
| Tabela 2 Número de alelos observados para cada <i>locus</i> nos rebanhos de ovinos Santa Inês do estado do Espírito Santo e total de alelos observados em cada <i>locus</i> | 24 |
| Tabela 3 Comparação entre números de alelos encontrados de 4 <i>loci</i> por Yilmaz et al (2013) e no estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo. | 25 |
| Tabela 4 Comparação entre números de alelos encontrados de 4 <i>loci</i> por Qwabe et al. (2013) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Espírito Santo..... | 25 |
| Tabela 5 Comparação entre números de alelos encontrados de 3 <i>loci</i> por Al-Barzinji et al (2011) e no estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo..... | 26 |
| Tabela 6 Comparação entre números de alelos encontrados de 3 <i>loci</i> por Kevorkian et al (2010) e no estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo..... | 26 |
| Tabela 7 Diversidade alélica, Heterozigosidade observada, Heterozigosidade esperada, Conteúdo de Informação polimórfica (PIC) dos <i>locus</i> analisados nesse trabalho..... | 27 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Bandas visualizadas após corrida eletroforética capilar do locus MAF65. | 21 |
| Figura 2 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um homozigoto..... | 22 |
| Figura 3 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um heterozigoto..... | 22 |
| Figura 4 Dendrograma da fazenda AE (localizada em Alegre - ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado..... | 29 |
| Figura 5 Dendrograma da fazenda GUA (localizada em Guarapari - ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado..... | 30 |
| Figura 6 Dendrograma da fazenda COL (localizada em Colatina - ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado..... | 31 |
| Figura 7 Dendrograma da fazenda AZ (localizada em Guaçuí – ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado..... | 32 |
| Figura 8 Dendrograma da fazenda RV (localizada em Rive - ES), mostrando 5 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado..... | 33 |
| Figura 9 Dendrograma da fazenda AL (localizada em Alegre -ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado..... | 34 |

APÊNDICE

Resultados da pesquisa mostrando os alelos observados para cada rebanho, para cada animal e para cada *loci* microsatélite analisados neste trabalho.....45

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 3 |
| 2. Justificativas..... | 7 |
| 3. Objetivos..... | 9 |
| 3.2 Objetivo Geral..... | 9 |
| 3.3 Objetivos específicos..... | 9 |
| 4. Revisão Bibliográfica..... | 10 |
| 4.1 A ovinocultura no Brasil..... | 10 |
| 4.2 Ovinocultura no Estado do Espírito Santo..... | 11 |
| 4.3 Raça Santa Inês..... | 12 |
| 4.4 Marcadores Moleculares e o uso de marcadores microssatélite no melhoramento | 13 |
| 4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... | 13 |
| 4.6 Coleta e armazenamento de amostras de pelos | 15 |
| 4.7 Diversidade Genética..... | 16 |
| 5. Material e Métodos..... | 18 |
| 5.1 Coleta e armazenamento de amostras | 18 |
| 5.2 Extração do DNA..... | 19 |
| 5.3 PCR e genotipagem dos <i>loci</i> microssatélites..... | 19 |
| 5.4 Análise estatística dos dados..... | 22 |
| 6. Resultados e discussão..... | 24 |
| 7. Conclusão..... | 35 |
| 8. Referências bibliográficas..... | 36 |

1. INTRODUÇÃO

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticados pelo homem. Sua criação possibilitava a obtenção de alimento através do consumo da carne e do leite, e proteção, pelo uso da lã, fibra que servia como abrigo contra as intempéries do ambiente. A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes sendo que a ampla difusão da espécie se deve principalmente a seu poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. A criação ovina está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

As expectativas em relação à criação de ovinos no Brasil têm estado em alta nos últimos anos. Relatos sobre as vantagens e perspectivas do crescimento da atividade têm sido constantes (REIS, 2009).

Segundo dados do IBGE (2010), foi verificado um aumento de 3,38% na população de ovinos no Brasil, em relação ao ano de 2009, com um total de 17.380 milhões de cabeças. A região Nordeste apresenta 56,7% dos animais, sendo a região Sudeste a que ocupa o quarto lugar no ranking, com 4,5% no rebanho nacional. Dentre os estados desta última região, São Paulo aparece em primeiro lugar (59,8%), seguido de Minas Gerais (29,2%), Rio de Janeiro (6,2%) e Espírito Santo (4,8%).

O crescimento da ovinocultura brasileira voltada para um mercado moderno, exigente em qualidade, impulsionou o aumento da produção de cordeiros para

abate. Entretanto, a produtividade da criação ovina no Brasil ainda está longe de atingir níveis compatíveis com a real capacidade de produção. Juntamente com este potencial de crescimento e desenvolvimento da produção, apresentam-se também os índices produtivos dos rebanhos ovinos, que podem produzir até 4,5 vezes mais carne/ha/ano que os bovinos, destacando assim a importância social e econômica que esta espécie tem e que pode vir a desempenhar no contexto socioeconômico do país (MEDEIROS, 2002).

Segundo Barbosa et al. (1995), a escolha de raças adequadas às condições ambientais locais é um dos fatores preponderantes para o sucesso de um sistema de criação economicamente viável. As raças ovinas naturalizadas brasileiras, como por exemplo, a Santa Inês, se destaca pela rusticidade e capacidade de adaptação a regiões de clima tropical e subtropical. Características como capacidade de resistir aos períodos de restrição alimentar impostos pelo período de seca, assim como a capacidade de apresentar resistência a diversos tipos de agentes patogênicos, conferem a esta raça os atributos necessários para classificá-las como detentoras de recursos genéticos importantes para uso futuro (LEGUIZA, 2007).

A conservação e o melhoramento de raças naturalizadas justificam-se tanto em animais puros quanto naqueles utilizados em cruzamentos. É necessário que se defina o ambiente em que estas raças são mais produtivas, criando-se, assim, interesse por parte dos criadores, ao perceberem melhor retorno financeiro. A conservação dessas raças está intimamente ligada à sua utilização. Assegurando a sua sobrevivência, possibilita que no futuro as mesmas constituam fonte de material genético capaz de melhorar a resistência a condições desfavoráveis do ambiente de criação (MARIANTE et al., 2011).

Para que ocorra a manutenção das raças naturalizadas de ovinos brasileiros nos sistemas de produção existentes, faz-se necessário a identificação de características importantes destas raças que poderão desempenhar um importante papel em nichos de mercado específicos, criando-se assim interesse por parte dos criadores, ao perceberem que podem utilizar as raças locais e obter um maior retorno financeiro (LEGUIZA, 2007). Consequentemente, a sobrevivência destas raças irá permitir que futuramente as mesmas possam vir a constituir fonte de material genético capaz de melhorar a resistência de outras raças a condições desfavoráveis do ambiente de criação (NOTTER, 1999).

Na atualidade, os recursos genéticos de ovinos possuem grande força econômica e cultural para muitos países, destacando-se países membros da Comunidade Européia, que iniciaram um grande projeto de caracterização sócio-econômica e genética das principais raças de caprinos e ovinos de modo que os resultados obtidos ofereçam uma visão holística dos recursos existentes bem como seu uso potencial e sua viabilidade econômica nos mais diversos sistemas de produção (MARSAN, 2005).

A América do Sul é uma das regiões com grande potencial para crescimento da ovinocultura de maneira competitiva frente ao mercado mundial. Contudo, há uma série de problemas que vão desde aspectos culturais até os financeiros, que impedem este avanço. Como forma de iniciar um programa de conservação e melhoramento das raças de ovinos no Brasil, é necessário um conhecimento mínimo dos principais padrões de diversidade genética existentes entre e dentro das raças. (PAIVA et al., 2005).

Segundo Rosa (2009), o recente progresso observado na genética molecular nas últimas décadas gerou conhecimento e ferramentas muito interessantes para estudos genéticos e populacionais, aumentando a capacidade em identificar espécies e caracterizar a biodiversidade de diversos ecossistemas brasileiros, assim como avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de animais de importância econômica.

A caracterização genética é importante para os programas de conservação de recursos genéticos animais, pois avalia a distância entre as populações em estudo e pode auxiliar na escolha dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*, mediante a estimativa de índices de similaridade entre os indivíduos analisados. Além disso, possibilita a indicação de acasalamentos ou cruzamentos que favorecerão a manutenção da variabilidade genética e evita esforços na manutenção de amostras que geneticamente seriam similares (EGITO et al., 2001).

Os marcadores moleculares microssatélites (SSR) apresentam alta sensibilidade, elevada capacidade de discriminação entre indivíduos, alto polimorfismo, heterozigose elevada e praticidade em rotinas laboratoriais. Estas características tornaram este marcador útil para a realização de testes de parentesco, genética forense, caracterização e análise de diversidade genética (GAO et al., 2007). Sua abundância no genoma e altos níveis de polimorfismo e co-

dominância fazem dele uma ferramenta importante para análises genômicas (CRISPIM et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVAS

O melhoramento genético animal pode ser entendido como um conjunto de processos seletivos e de direcionamento dos acasalamentos, cujo objetivo é aumentar a frequência dos genes de efeitos desejáveis ou das combinações genéticas favoráveis em uma população, com a finalidade de aperfeiçoar a capacidade de produção dos animais que apresentam interesse econômico para o homem em um dado ambiente. Para atingir tal finalidade, o homem dispõe de duas ferramentas básicas: a seleção de progenitores e os métodos de acasalamento (FACÓ E VILLELA, 2005).

O melhoramento genético é uma das principais ferramentas e a que mais merece atenção dentre as utilizadas para o crescimento e desenvolvimento de uma atividade pecuária. Logo, esforços concentrados no mesmo promovem a mudança nos genótipos existentes de forma a permitir avanços produtivos e assim requerer novas pesquisas nas demais áreas do conhecimento. Pode-se assim dizer que o melhoramento genético é a mola propulsora do desenvolvimento de uma exploração pecuária (LÔBO E LÔBO, 2007).

Os primeiros estudos de identificação, caracterização e utilização de marcadores moleculares para a caracterização de recursos genéticos e geração de ferramentas para o melhoramento animal datam do final da década de 80. Nos últimos 20 anos as tecnologias para geração de dados moleculares passaram por vários ciclos de renovação (CAETANO, 2009).

As espécies domésticas têm sido submetidas ao melhoramento genético visando, principalmente, selecionar, multiplicar e distribuir os animais com características favoráveis, para tornar os rebanhos mais produtivos. A seleção direcionada, associada à utilização de poucos reprodutores para diversas matrizes, aumenta as chances de acasalamentos entre indivíduos aparentados e, conseqüentemente, aumenta a consanguinidade do rebanho, além de reduzir o tamanho populacional efetivo e a variabilidade genética (FALCONER E MACKAY, 1996; MATEUS et al., 2004).

Destaca-se como principal efeito devido aos níveis elevados de consanguinidade o aumento de homozigose, que por sua vez, pode levar a um processo conhecido como “Depressão Endogâmica” que pode reduzir sensivelmente a produtividade de um rebanho (BREDA et al., 2004; CARNEIRO et al., 2007). Segundo Eding (2001), a perda contínua de diversidade genética de uma raça reduz a possibilidade de melhoramento genético no futuro.

Com o crescimento da ovinocultura no Estado do Espírito Santo, faz-se necessário uma caracterização genética de rebanhos da Raça Santa Inês, uma das mais produzidas no Estado para que não haja a perda de importante material genético, incluindo características importantes para a sobrevivência da raça.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética de ovinos da raça Santa Inês produzidas no centro e sul do estado do Espírito Santo, visando à identificação de indivíduos aparentados e não aparentados dentro e entre rebanhos.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar geneticamente rebanhos da raça Santa Inês do Estado do Espírito Santo a partir do uso de marcadores moleculares microssatélites;
- Verificar a variabilidade genética dos ovinos Santa Inês do Estado do Espírito Santo através da eletroforese capilar

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Ovinocultura no Brasil

A exploração de animais domésticos, como forma de produzir alimento, vem se intensificando com o passar do tempo. Dado o desequilíbrio entre oferta e demanda relacionada à produção de carne, se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas que explorem e intensifiquem a produção em outras espécies animais, além da bovina, suína e avícola. A carne ovina, no Brasil, possui baixo consumo, principalmente devido à má qualidade do produto comercializado. Ultimamente, tem-se notado o interesse em intensificar a terminação de cordeiros em confinamento, objetivando rapidez para a comercialização e produção de carcaça de melhor qualidade. (GARCIA et al., 2000)

A ovinocultura brasileira apresentou nos últimos anos grande expansão em diversas regiões do país, traduzida pelo aumento do consumo da carne ovina (SIMPLÍCIO E SIMPLÍCIO, 2006) e crescente procura por leite e derivados (BRITO, 2006). Devido a suas excelentes propriedades nutricionais, baixo requerimento de área e velocidade no retorno do capital investido, a produção de ovinos vincula-se como uma das atividades rurais com maior potencial econômico da pecuária nacional (DORNELLES, 2002).

Atualmente a carne ovina é o produto de maior significância para a cadeia produtiva da ovinocultura em termos de valor de mercado. O mercado consumidor,

principalmente o internacional, é marcado por algumas tendências que devem ser observadas. A carne ovina é vista como um produto premium e seu consumo é ligado à população de maior poder aquisitivo nos países importadores. Assim, seu consumo é aspirado também pela parcela da população que tem obtido incremento de renda recente, principalmente nos países em desenvolvimento (BARCHET et al, 2011).

4.2 Ovinocultura no Estado do Espírito Santo

Raças nacionais como o Santa Inês tem apresentado considerável aumento nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, em virtude de sua elevada rusticidade, alta prolificidade, menor susceptibilidade aos parasitos e maior eficiência reprodutiva, apresentando cios durante todo o ano (BUENO et al., 2000), o que sugere sua utilização como raça materna visando à produção de cordeiros para abate.

A criação de cabras e ovelhas – conhecida como caprinovinocultura, vem se destacando no Estado como uma importante alternativa de maior rentabilidade das famílias do campo, no entanto, é pouco desenvolvida. Esse fato se deve à falta de um plano destinado a toda cadeia produtiva da atividade.

Os ovinos ganham destaque por serem resistentes à seca, bastante flexíveis na sua alimentação (podendo consumir quase todos os tipos de matéria vegetal), atrelado a baixa exigência de água. Por estes motivos, a sua criação é muito vantajosa frente à de bovinos e suínos.

Outro fator que coloca o Espírito Santo na frente para a comercialização dos produtos da caprinovinocultura é sua localização. Além de ser um Estado situado próximo aos principais centros econômicos do país, há também a facilidade de escoamento da produção para o mercado externo, o que contribui para a melhor comercialização da produção.

A agricultura familiar se destaca na ovinocultura, uma vez que para tal é exigida pouca área territorial e pouca disponibilidade de mão-de-obra, reduzindo visivelmente os custos de produção (MORAIS, 2007).

4.3 Raça Santa Inês

De acordo com Santos (2007), a raça Santa Inês foi desenvolvida e originada no Nordeste brasileiro, através de cruzamentos alternados entre as raças Morada Nova, Somalis, Bergamacia e outros ovinos sem raça definida.

Santos (2007) relata como padrão racial dos ovinos Santa Inês, um animal deslanado, com pelos curtos e sedosos, de grande porte, carne de boa qualidade e baixo teor de gordura, pele de boa qualidade, rústico e precoce, adaptável a qualquer sistema de criação e a diversos tipos de pastagens. As fêmeas são muito prolíferas, com boa aptidão materna, boa produção de leite e altas taxas de gestação gemelar.

Alguns dos mais renomados criatórios de reprodutores têm suas produções vendidas a futuro, tendo as mesmas já compromissadas até a metade do ano seguinte, só com base na genealogia dos animais, sem a mínima preocupação com relação ao desempenho dos animais (Benitez *et al.*, 2008). No entanto, segundo Costa et al. (2012), o aumento do mercado consumidor tem provocado maior interesse e investimento dos produtores no melhoramento genético de ovinos Santa Inês.

Atualmente, a raça Santa Inês possui grande destaque, concentrando-se no principal pólo da ovinocultura brasileira, que por sua vez é representado pelo Nordeste. Há mais de uma década que a raça Santa Inês atravessa um momento comercial excepcional, ocupando um lugar preponderante na pecuária nacional, com expansão rápida em grande parte do território nacional, criando desta forma uma demanda crescente e insatisfeita.

A crescente demanda de produtos de origem animal nos países em desenvolvimento, visando à obtenção de um substancial aumento na produtividade, deu origem a vários programas de melhoramento que tinham como base o uso intensivo de cruzamentos do germoplasma *local* com raças *exóticas*, altamente produtivas, desenvolvidas para os países de clima temperado (EGITO et al, 2002).

4.4 Marcadores moleculares e o uso de Marcadores Microssatélites no melhoramento animal

Os Marcadores Moleculares têm sido os fatores mais importantes no estudo de segregação de caracteres hereditários, na análise de comportamento de genes em uma população e na reconstrução da história evolutiva das populações, entre outras aplicações (REGITANO e VENERONI, 2009).

Existem duas grandes classes de marcadores que se diferenciam pela metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os marcadores identificados por hibridização estão os RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locos VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Os identificados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), AFLP (“Amplified Fragment Polymorphism”) e Microssatélites ou SSR (“Simple Sequence Repeats”) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os primeiros trabalhos realizados para desenvolver e caracterizar marcadores moleculares para espécies de interesse zootécnico datam do início dos anos 80. As primeiras publicações relatam resultados de estudos de caracterização de marcadores RFLP (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism) em suínos (CHARDON et al., 1985) e bovinos (BECKMANN et al., 1986, GEORGES et al., 1987). Estes estudos, inicialmente com metodologias trabalhosas e limitadas, eram considerados inovadores, uma vez que as alternativas disponíveis resumiam-se a estudos com grupos sanguíneos e aloenzimas. Tipicamente, para produzir uma informação molecular (um genótipo) eram necessários em média cinco dias de trabalho, utilizando radioisótopos e enfrentando várias questões técnicas fundamentais (CAETANO, 2009).

Nos anos seguintes, foram realizados os primeiros estudos para isolar e caracterizar marcadores do tipo SSR (Simple Sequence Repeats). Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem. Essas regiões são denominadas microssatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*) (BORÉM E CAIXETA, 2009).

Esforços significativos foram empregados para identificar microssatélites em bovinos (FRIES et al., 1990; MOORE et al., 1994; VAIMAN et al., 1994; STONE et

al., 1995; KIRKPATRICK et al., 1995; STONE et al., 1997; REED et al., 2001), suínos (JOHANSSON et al., 1992; MILLER et al., 1992; COPPIETERS et al., 1993; FREDHOLM et al., 1993; ALEXANDER et al., 1996) e equinos (JOHANSSON et al., 1992; MARKLUND et al., 1994; HOPMAN et al., 1999; MURPHIE et al. 1999; RUTH et al., 1999) e ovinos (MENEZES et al., 2006; CRISPIM et al., 2012; LEGUIZA, 2007). Tal metodologia trouxe muitos benefícios, associados, principalmente, às bases moleculares desse tipo de marcador.

Inicialmente a genotipagem dos marcadores microssatélites (SSR) era realizada com o uso de radioisótopos. Posteriormente, com a invenção dos seqüenciadores automáticos, tornou-se possível utilizar fluorocromos para detecção dos variantes alélicos. Os primeiros mapas genéticos abrangentes para espécies de interesse zootécnico foram construídos com marcadores microssatélites (BARENDSE et al., 1994; ROHRER et al., 1994; GUERIN et al., 2003).

Em genomas eucariotos, estas sequências simples são mais frequentes, melhor distribuídas ao acaso e formam *loci* genéticos mais polimórficos que os *loci* hipervariáveis constituídos por minisatélites. Estes *loci* altamente polimórficos, amplificados via PCR foram também denominados de “STMS – Sequence Tagged Microsatellite Sites” (Beckmann & Solle, 1990), ou seja, sítios de microssatélites marcados por sequência, e constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponível hoje.

Tendo em vista a expressão co-dominante (é possível diferenciar o indivíduo homocigoto e heterocigoto para cada determinado *loci*) e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, ou seja, “PIC” (“Polymorphism Information Content”) na terminologia de marcadores moleculares. Além disso, os SSR são muito frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. Considerando as características dos SSR já citadas, este se torna o marcador ideal para estudos de genéticas de populações atrelado a diversidade. (GRATTAPAGLIA E FERREIRA, 1998)

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Uma das mais marcantes contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica de PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase) desenvolvida por Kary Mullis, em 1983 (MULLIS, 1990). Porém, a importância desta técnica só ficou demonstrada com a publicação dos primeiros trabalhos de aplicação desta em diagnósticos de doenças (SAIKI et al., 1985).

A Reação em Cadeia da Polimerase consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada pela DNA polimerase. A reação envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A primeira etapa da PCR consiste na desnaturação inicial da dupla fita de DNA que contém a sequência a ser amplificada, ocorrendo quando a temperatura é elevada entre 92 e 96°C. Nesta etapa, as pontes de hidrogênio se “quebram”, separando as fitas de DNA. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e sequência do primer utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada primer com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os dois primers curtos são hibridizados a filamentos opostos, cada um se liga a uma fita diferente do fragmento alvo nas posições que flanqueiam a região da sequência a ser amplificada, estando orientados de forma que suas extremidades 3' apontem uma para a outra (MOURA DUARTE et al., 1999). Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers, esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é feito em algumas centenas de vezes, dobrando a quantidade de DNA da sequência alvo em uma progressão geométrica.

A duração de um ciclo é de cerca de 5 minutos, consistindo de 15 segundos para a desnaturação, 30 segundos para o anelamento, 90 segundos para a extensão e mais o tempo mínimo necessário para a mudança de temperatura entre as fases, que é de 30 a 60 segundos para cada mudança (NICHOLAS, 1999).

4.6 Coleta e armazenamento de amostras de pelos

A porção final da cauda dos ovinos foi comprovada como a área mais eficaz para se efetuar a retirada dos pelos (LEAL et al., 2011). Esta é de fácil acesso, possui geralmente uma grande quantidade de pelos em um tamanho médio que

facilita sua retirada e mantém uma boa porcentagem de pelos acompanhados de bulbos em relação à quantidade total de pelos retirados.

Segundo Leal (2011), foram testados tubos eppendorf, sacos de papel e sacos de plástico como maneiras de armazenamento dos pelos com bulbos. Os sacos de papel pardo não encerados se mostraram a melhor opção por propiciar uma baixa adesão dos bulbos às suas paredes o que, quando acontece, geralmente ocasiona a perda das células.

4.7 Diversidade Genética

A biodiversidade é produto da evolução biológica cuja variedade de formas é resultado do acúmulo de variações hereditárias, inicialmente polimórficas dentro de espécies que, posteriormente, se fixam em unidades taxonômicas. Assim, todas as formas de vida do planeta são caracterizadas por variações genéticas que podem ser estudadas para fins de inventário biológico e conservação.

A diversidade genética se refere a toda variação biológica hereditária acumulada durante o processo evolutivo. Sua principal origem converge-se nos processos de mutação na sequência nucleotídica durante a replicação do DNA. Quando esta variação ocorre entre indivíduos da mesma espécie, chamamos de polimorfismos ou diversidade intraespecífica. Quando esta variação ocorre entre espécies, sendo fixada dentro de cada táxon, dizemos que se deu uma substituição de caráter, que pode ser nucleotídica (DNA) ou aminoacídica (proteína). As variações genéticas intraespecíficas são investigadas quando buscamos compreender as relações entre indivíduos e populações de cada espécie. Portanto, quando nosso interesse é saber qual o parentesco entre indivíduos, se existe ou não fluxo gênico entre populações ou qual o status de conservação de uma espécie em particular, estudamos a variação genética intraespecífica. Por outro lado, a diversidade genética entre espécies é avaliada quando queremos compreender as relações filogenéticas nos vários níveis taxonômicos (espécies, gêneros, famílias, ordens etc.) ou caracterizar espécies por meio da identificação de marcadores conservados que permitam sua diferenciação (SANTOS, 2009)

A sobrevivência de uma espécie depende de sua variabilidade genética, e a quantificação dessa variabilidade pode ser um parâmetro predominante na

caracterização de raças de animais. A análise do DNA possibilita detectar a existência de marcadores genéticos polimórficos, que podem ser usados em estudos evolutivos, mapeamento genético, identificação de paternidade, taxonomia molecular, introgressão de genes, diagnóstico genético precoce e seleção assistida por marcadores (NICHOLAS, 1999).

Por meio das técnicas moleculares, foi possível avançar no conhecimento das características de um indivíduo, quanto ao genótipo, a partir de amostras de sangue, pelos e tecidos. A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi desenvolvida por Williams et al. (1990), e pode ser utilizada para quantificar a variabilidade genética entre e dentro de diferentes grupamentos genéticos, em espécies distintas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e Armazenamento de amostras

O material escolhido para a extração do DNA foi o bulbo íntegro do pelo, devido à facilidade da coleta e armazenamento, e por não causar estresse ao animal. Os pelos foram coletados da porção final da cauda dos animais, de forma que os bulbos pilosos pudessem se manter na maior parcela de pelos retirados, já que são estas as fontes de células usadas para a obtenção do DNA (LEAL, 2011).

No presente trabalho foram analisados 20 animais de 6 rebanhos localizados no estado da Espírito Santo: 1 rebanho localizado em Colatina (região Centro-oeste), 1 rebanho em Guarapari (região Metropolitana), 1 rebanho em Guaçuí e Rive e 2 em Alegre (região Sul), totalizando 120 animais.

As amostras coletadas em cada fazenda foram identificadas da seguinte maneira: AE = Rebanho Alegre; GUA = Rebanho Guarapari; AZ = Rebanho Guaçuí; RV = Rebanho Rive; COL = Rebanho Colatina; AL = Rebanho Alegre 2.

Imediatamente após a coleta dos pelos, estes foram armazenados em sacos de papel pardo com superfície não encerada, com o objetivo de manter a integridade dos seus bulbos até o momento de sua análise (LEAL, 2011).

5.2 Extração do DNA genômico

Foram utilizados 10 bulbos dos pelos coletados de cada animal para cada reação de extração de DNA. Cada pelo foi observado ao microscópio óptico (Bioval, modelo 008055) com a objetiva de 4/0.10X para a certificação da integridade e presença do bulbo, em seguida este foi cortado e colocado em microtubos de 1,5 mililitros onde realizou-se a reação de extração de DNA.

Para a realização da extração do DNA foi utilizado o método de extração alcalina. Após o corte dos bulbos, adicionou-se 50µl de solução de lise (200Mm NaOH). Os microtubos foram colocados no termociclador e incubados a 97°C por 15 minutos, para que ocorra a lise das membranas celulares e conseqüentemente dispersão do DNA celular. As amostras são submetidas a centrifugação à 13000 RPM por 1 minuto, visando separar o DNA das organelas e proteínas presentes no interior das células que, após a lise celular, estarão dispersas na solução. Na próxima etapa, adicionou-se 50µl de solução neutralizante (200Mm HCl; 100Mm Tris-HCl ph 8,5), homogeneizando bem, essa solução tem o objetivo de parar a atividade de lise da primeira solução e neutralizar o pH de toda a reação. Após a realização de todas as etapas de extração as alíquotas foram armazenadas em geladeira a 4°C.

5.3 PCR e genotipagem dos *loci* microssatélites

Para a realização das reações de PCR foram selecionados 7 *locis* microssatélites, de acordo com a lista de recomendação da FAO, para estudos de diversidade genética e paternidade em ovinos (Tabela 1). Assim, estimou-se um total de 840 amostras de PCR a serem analisadas.

Tabela 1 *Loci* analisados, temperaturas de anelamento utilizadas, sequência de cada primer, tamanho do fragmento esperado, cromossomo onde ele se localiza em *Ovis aries*.

| <i>Locus</i> | Temperatura Anelamento (°C) | Sequência do Primer 5' - 3' | Tamanho esperado de fragmento (pb) | Cromossomo em <i>Ovis aries</i> |
|--------------|-----------------------------|---|------------------------------------|---------------------------------|
| OarFCB020 | 56 | AAATGTGTTTAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC | 92-112 | 2 |
| OarFCB011 | 58 | GGCCTGAACTCACAAGTTGATATATCTATCAC GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC | 121-143 | 2 |
| SRCRSP08 | 58 | TGCGGTCTGGTTCTGATTTTAC CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAG | 212-242 | Desconhecido |
| OarCP049 | 58 | CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC GTGGGGATGAATATTCCTTCATAAGG | 85-107 | 17 |
| SRCRSP05 | 56 | TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG | 141-149 | 18 |
| MAF65 | 54 | AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG | 123-135 | 15 |
| OarFCB304 | 59 | CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG | 150-188 | 19 |

As reações de PCR foram realizadas separadamente para cada *locus* em volumes de 10 µl por reação, contendo tampão para PCR [5X Green Go Taq Flexi Buffer], dNTPs (10mM de cada), MgCl₂ (1,0-3,0 mM), Taq DNA polimerase (1U), um par de primers (20 p/mol de cada primer), água deionizada e 5 microlitros de DNA pré-diluído 25x. As concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂) foram otimizadas individualmente para cada *locus*, podendo variar entre 1,0 e 3,0 mM. Em cada reação foram utilizados controles negativos para monitorar possíveis contaminações. O programa de PCR obteve um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguindo-se 30-40 ciclos de amplificação, sendo que em cada ciclo estabeleceu-se um tempo de 30 segundos para a desnaturação da dupla fita a 94°C, 30 segundos para o anelamento dos primers, e 60 segundos para a síntese da nova fita a 72°C. Após o último ciclo, as reações foram submetidas a um passo final de 5 minutos a 72°C para a extensão final das fitas. O número de ciclos e as temperaturas de anelamento dos primers foram otimizadas para cada locus de microssatélite. O sucesso da amplificação por PCR foi observado em géis de poliacrilamida (30%) com 20 centímetros de tamanho para uma corrida extensa com o objetivo de separar fragmentos de DNA que pudessem diferir por uma pequena quantidade de pares de base. Juntamente com as amostras, foram aplicados padrões de peso molecular

(25pb e 100pb) para a comparação do tamanhos dos fragmentos obtidos. Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata.

Para a coloração, os géis foram mergulhados em uma solução fixadora (100ml de Etanol, 5ml de Ácido Acético e 895ml de água destilada) por 5 minutos. Depois, foram adicionados 50ml de solução de Nitrato de Prata (0,2g de Nitrato de Prata e 50ml de Água destilada) por 10 minutos. As soluções foram descartadas, o gel, lavado com água destilada por 2 minutos, sendo descartada em seguida. Por fim, o gel foi mergulhado na solução Reveladora (30g NaOH, 5ml de Formol e aproximadamente 900ml de Água) até que as bandas do gel, correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados aparecessem. Todas as etapas foram executadas com leve agitação.

Após a visualização em gel de poliacrilamida, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar no equipamento AdvanCE FS96 (Advanced Analytical). A genotipagem dos alelos foi realizada nos softwares GenScan e Genotyper, ambos da Applied Biosystems. Na figura 1 podem ser observadas bandas obtidas em corrida eletroforética capilar para o locus MAF65.

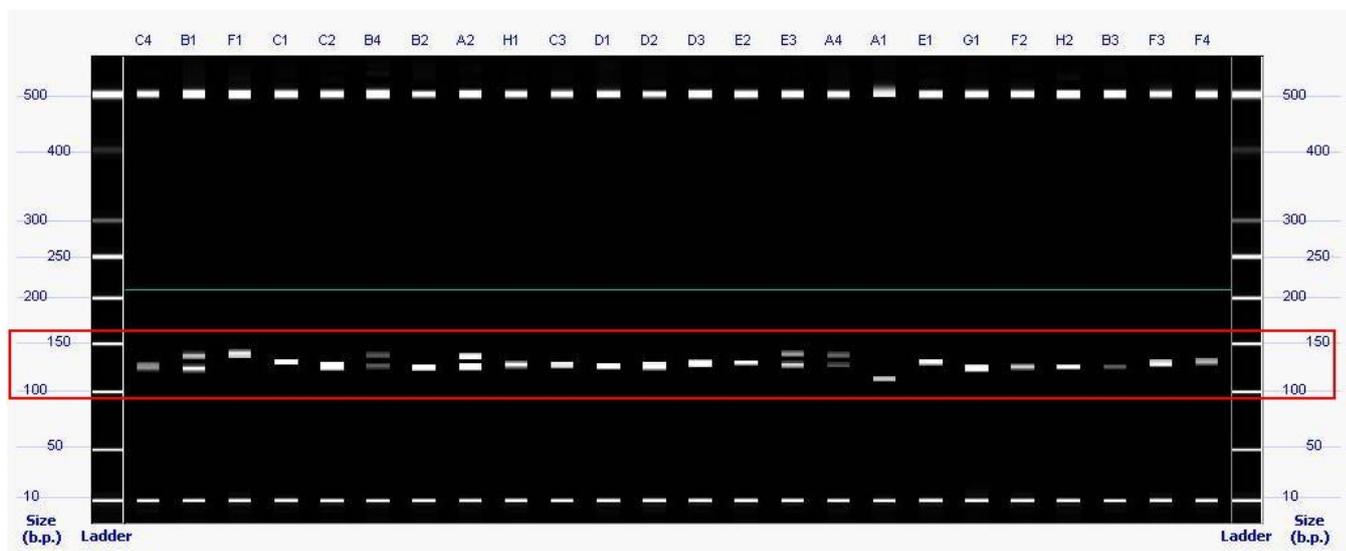


Figura 1 Bandas visualizadas após corrida eletroforética capilar do locus MAF65

Podem ser observados nas figuras 2 e 3 gráficos gerados após corrida eletroforética capilar mostrando um indivíduo homozigoto e heterozigoto, respectivamente.

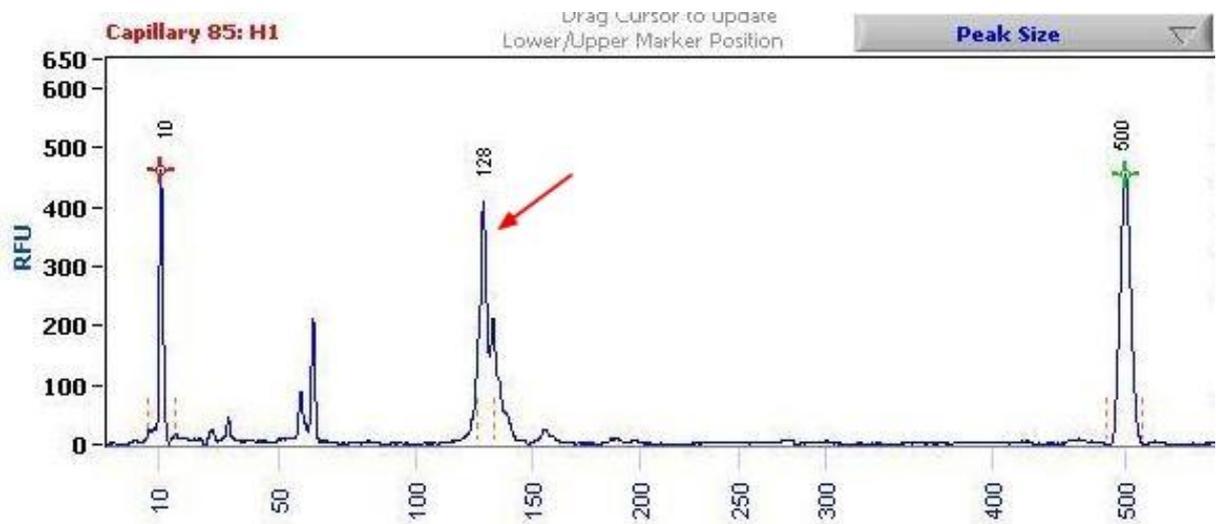


Figura 2 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um homozigoto.

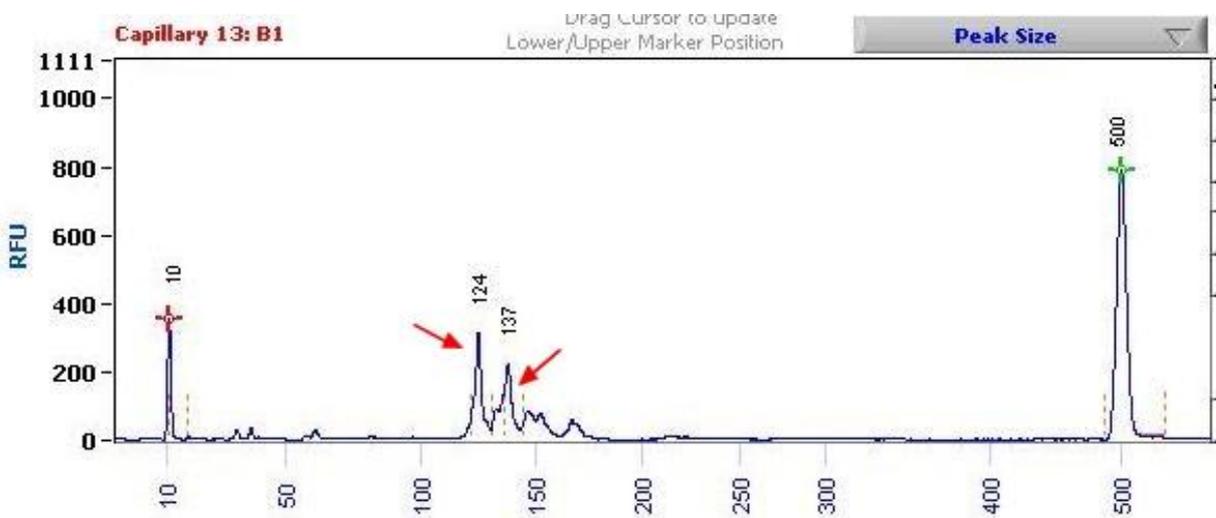


Figura 3 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um heterozigoto.

5.4 Análise estatística dos dados

A variabilidade genética foi quantificada a partir de estimativas de contagem direta das frequências alélicas para cada locus utilizado. Os parâmetros genéticos populacionais utilizados para estimar a diversidade foram o número efetivo de alelos por *locus*, diversidade alélica, heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade

esperada (H_e) sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e o índice de fixação (FIS) ou coeficiente de consanguinidade. Com o objetivo de identificar a existência de possíveis alelos nulos nos *locus* utilizados, foi estimada a probabilidade de ocorrência dos mesmos nas populações analisadas.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein et al. (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediantemente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

A partir do índice de proporção de alelos compartilhados, foi feita uma análise no software Genes (Cruz, 2013), utilizando o Índice Ponderado, gerando assim uma matriz de dissimilaridade. A partir desses dados foi realizado um dendrograma para estimar quais seriam os animais mais próximos ou mais distantes dentro dos rebanhos do estado do Espírito Santo. Para obtenção do dendrograma foi usado o software Action2.5, juntamente com os dados de matriz de dissimilaridade. Para obtenção da heterozigotidade esperada (H_e), heterozigotidade observada (H_o), coeficiente de endogamia (f) e índice de informação polimórfica (PIC) utilizou-se o software PowerMarker V3.25.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados sete diferentes *loci* microssatélites, todos dinucleotídeos. Para todos os animais dos seis rebanhos utilizados no trabalho, cada um dos *loci* foi estudado com o objetivo de se obter sua variabilidade alélica.

Na tabela 2 foi determinada a quantidade de alelos encontrados em cada rebanho para cada *locus* microssatélite analisado.

Tabela 2 Número de alelos observados para cada *locus* nos rebanhos de ovinos Santa Inês do estado do Espírito Santo e total de alelos observados em cada *locus*.

| <i>Locus</i> | AE | GUA | COL | AZ | RV | AL |
|------------------|----|-----|-----|----|----|----|
| OarFCB20 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| OarFCB011 | 7 | 4 | 8 | 5 | 7 | 5 |
| SRCRSP08 | 2 | 3 | 1 | 3 | 4 | 4 |
| OarCP049 | 6 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| SRCRSP05 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| MAF65 | 6 | 5 | 3 | 4 | 6 | 5 |
| OarFCB304 | 4 | 3 | 4 | 5 | 4 | 4 |

Todos os sete *loci* microssatélites analisados foram polimórficos para caracterização genética da raça Santa Inês. O número de alelos por *locus* variou de três a dez. Contudo, o *locus* mais polimórfico analisado foi o OarFCB011, observando-se 10 alelos nas populações estudadas. O segundo *locus* mais polimórfico foi o MAF65, onde foi observado um total de 8 alelos.

Na tabela 3 é apresentado o número de alelos encontrados no presente trabalho e também encontrados por Yilmaz et al. (2013) para duas raças de ovinos nativas da Turquia, a Çine Çapari e a Karya, as quais apresentaram para o *locus* OarFCB304 onze e treze alelos, respectivamente.

Tabela 3 Comparação entre números de alelos encontrados de 4 *loci* por Yilmaz et al (2013) e no estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo.

| <i>Locus</i> | Yilmaz et al. (2013) | | Estudo feito com Santa Inês do estado do Espírito Santo |
|--------------|----------------------|----|---|
| | Çine Çapari / Karya | | |
| OarFCB304 | 11 | 13 | 6 |
| MAF65 | 9 | 7 | 8 |

Ambas apresentaram alto grau de polimorfismo, enquanto que o número de alelos encontrados neste trabalho para a raça Santa Inês no mesmo *locus* foi de seis alelos. Entretanto, para o para o *locus* MAF65 Yilmaz et al. (2013) obtiveram para Çine Çapari e Karya, nove e sete alelos, respectivamente, e neste trabalho, foram obtidos oito alelos para este *locus*, havendo variação de somente um alelo. Por conseguinte, o polimorfismo entre os dois trabalhos apresentou-se próximo.

De acordo com os dados obtidos por Qwabe et al. (2013), demonstrados na tabela 4, há 4 *loci* em comum a este trabalho.

Tabela 4 Comparação entre números de alelos encontrados de 4 *loci* por Qwabe et al. (2013) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Espírito Santo.

| <i>Locus</i> | Qwabe et al. (2013) | Estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo |
|--------------|---------------------|--|
| SRCRSP08 | 7 | 4 |
| OarCP49 | 6 | 7 |
| SRCRSP05 | 2 | 3 |
| OarFCB011 | 5 | 10 |

Para o *locus* SRCRSP08 Qwabe et al. (2013) encontraram em seu trabalho sete alelos, em contrapartida, o estudo com os ovinos Santa Inês do sul do estado do Espírito Santo apresentou somente quatro alelos. Entretanto, os demais *loci* analisados por Qwabe et al. (2013) apresentaram números menores de alelos observados em comparação a esse trabalho, que por sua vez apresentou uma grande variabilidade alélica para o *locus* OarFCB011, sendo observados dez alelos.

A tabela 5 apresenta outra comparação entre o trabalho em questão e o de Al-Barzinji et al. (2011) realizado para verificar variabilidade genética em ovinos da raça Hamdani na região do Curdistão no Iraque.

Tabela 5 Comparação entre números de alelos encontrados de 3 *loci* por Al-Barzinji et al (2011) e no estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo.

| <i>Locus</i> | Al-Barzinji et al. (2011) | Estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo |
|--------------|---------------------------|--|
| OarFCB304 | 13 | 6 |
| OarFCB020 | 18 | 4 |
| MAF65 | 10 | 8 |

Para o *locus* OarFCB304, Al-Barzinji et al. (2011) encontraram uma grande variabilidade alélica observando treze alelos para o mesmo, enquanto que nesse trabalho foram encontrados somente seis alelos. Assim, Al-Barzinji et al. (2011) obteve uma alta variabilidade genética para a raça estudada, à medida que a raça Santa Inês apresentou uma menor variabilidade alélica para este *locus*. Entretanto, para o *locus* MAF65, houve uma diferença de somente dois alelos, na análise feita por Al-Barzinji et al. (2011) observou-se dez alelos e neste estudo, oito. Logo, a variabilidade alélica para as duas raças apresentaram-se muito próximas.

No estudo executado por Al-Barzinji et al. (2011), destaca-se o *locus* OarFCB020, que por sua vez apresentou dezoito alelos, no entanto, na análise feita com a raça Santa Inês foi observado somente quatro alelos para este *locus*. Para este mesmo *locus* Kevorkian et al. (2010), analisando a variabilidade de ovinos da Romênia das raças Karabash e Botosani Karakul, cujos resultados encontram-se dispostos na tabela 6 para a raça Karabash, obtiveram treze alelos. Logo, as raças analisadas por ambos apresentou uma grande variabilidade genética, principalmente a raça Hamdani, estudada por Al-Barzinji et al. (2011) sendo altamente polimórficos. Porém, o trabalho feito com a raça Santa Inês na região sul estado do Espírito Santo apresentou baixa variabilidade genética, apresentando somente quatro alelos para o *locus* OarFCB020.

Tabela 6 Comparação entre números de alelos encontrados de 3 *loci* por Kevorkian et al (2010) e no estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo.

| <i>Locus</i> | Kevorkian et al. (2010) | Estudo feito com os ovinos do estado do Espírito Santo |
|--------------|-------------------------|--|
| OarFCB011 | 12 | 10 |
| OarFCB020 | 13 | 4 |
| MAF65 | 10 | 8 |

Nas populações analisadas com ovinos da Romênia por Kevorkian et al. (2010), foram encontrados para os *loci* OarFCB11 e MAF65, doze e dez alelos, respectivamente, e neste estudo foram observados dez e oito alelos para ambos *loci*, ou seja, houve uma variação de somente dois alelos em comparação ao trabalho citado. Por conseguinte, constata-se uma menor variabilidade genética encontrada nos rebanhos de ovinos Santa Inês utilizados nesse estudo.

Na tabela 7 são apresentados a diversidade alélica, heterozigidade observada (H_o), heterozigidade esperada (H_e), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (f) encontrados para as populações estudadas neste trabalho.

Tabela 7 Diversidade alélica, Heterozigidade observada, Heterozigidade esperada, Conteúdo de Informação polimórfica (PIC) dos *locus* analisados nesse trabalho.

| <i>Locus</i> | Número de alelos observados | H_o | H_e | Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) | Coefficiente de Endogamia (f) |
|--------------|-----------------------------|--------|--------|--|-----------------------------------|
| OarFCB020 | 4 | 0,2571 | 0,5966 | 0,5233 | 0,5722 |
| OarFCB011 | 10 | 0,5424 | 0,8615 | 0,8466 | 0,3778 |
| SRCRSP08 | 4 | 0,0303 | 0,4673 | 0,4212 | 0,9361 |
| OarCP049 | 7 | 0,2286 | 0,6922 | 0,6414 | 0,6738 |
| SRCRSP05 | 3 | 0,0588 | 0,5304 | 0,4549 | 0,8901 |
| MAF65 | 8 | 0,3500 | 0,6689 | 0,6270 | 0,4806 |
| OarFCB304 | 6 | 0,4324 | 0,7012 | 0,6472 | 0,3872 |

A partir do coeficiente de endogamia (PIC) encontrado nesse trabalho, os *loci* OarFCB020, OarFcb011, OarCp049, MAF65 e OarFCB304 apresentaram-se altamente informativos com valores de PIC entre 0,5233 a 0,8466. No entanto, os *loci* SrCRSP08 e SRCRSP05 apresentaram-se mediantemente informativos, com valores de PIC entre 0,4212 e 0,4549, respectivamente.

O *locus* OarFCB020 apresentou um dos menores valores de diversidade alélica (4 alelos), com heterozigidade esperada de 0,5966 e heterozigidade

observada de 0,2571, que por sua vez apresentou-se menor que a encontrada no estudo feito por de Al-Barzinji et al. (2011), ou seja, um valor de 0,400.

Um valor de heterozigosidade observada inferior à heterozigosidade esperada significa, de acordo com Araújo et al. (2006), a perda de heterozigosidade. O alto valor obtido como Coeficiente de Endogamia indica alta homozigose observada para esse marcador, o que comprova a perda de alelos.

Para o *locus* SRCRSP08, o valor encontrado para a heterozogiosidade observada (0,0303) está muito abaixo da esperada (0,4673). Esses dados, comparados com o nível de endogamia (0,9361), indicam a perda de heterozigosidade do rebanho e um nível de endogamia relativamente alto. Qwabe et al. (2013) encontraram, para o *locus* em questão 7 alelos, H_o de 0,48; H_e de 0,44 e PIC igual a 0,40. Assim, a quantidade de alelos em homozigose encontra-se muito baixa, de acordo com esses dados Qwabe et al. (2013) obtiveram alta heterozigozidade.

O *locus* SRCRSP05 apresentou somente 3 alelos diferentes, e taxas de H_o mais baixas que as de H_e (0,0588 e 0,5304 respectivamente), indicando baixa heterozigosidade. Para esse mesmo *locus* Souza et al. (2012) encontraram em populações de ovinos Santa Inês de vários estados do Brasil valores H_o 0,609 e H_e 0,675, concluindo que nos rebanhos analisados uma alta taxa de heterozigosidade foi encontrada. Os *loci* OarFCB304 e OarFCB049 também foram utilizados no trabalho de Souza et al. (2012). Para esses *loci* foram encontrados H_o 0,740, H_e 0,531 e H_e 0,2124, H_o 0,2212 respectivamente, indicando para ambos um alto nível de heterozigose. Nos rebanhos analisados no estado do Espírito Santo, os valores encontrados para ambos os *loci* tiveram H_o inferior ao de H_e e um valor de coeficiente de endogamia acima de 0,5 foi encontrado no *locus* OarFCB049, revelando assim baixo nível de heterozigosidade. Porém para o *locus* OarFCB304 o valor de coeficiente de endogamia encontrado foi de 0,3872, indicando alto nível de heterozigozidade.

O *locus* MAF65 apresentou H_o 0,3500 e H_e 0,6689 e a presença de 8 alelos diferentes. Com o coeficiente de endogamia de 0,4806, este *locus* mostra alta heterozigosidade e baixa endogamia dos animais estudados. Sulabda et al. (2012) encontrou para o mesmo *locus* taxas de H_o 0,6538 e H_e 0,6184, comprovando em seu trabalho, para este *locus*, uma taxa alta de heterozigosidade.

O locus OarFCB304 apresentou H_o de 0,4324 e H_e de 0,7012, obtendo-se uma baixa taxa de heterosigozidade.

Em relação ao coeficiente de endogamia (f), houve uma variação entre 0,3778 e 0,9361, logo, os *loci* que obtiveram maior heterozigidade e conseqüentemente maior variabilidade foram o OarFCB011, o OarFCB304 e o MAF65, apresentando coeficiente de endogamia iguais a 0,3778; 0,3872 e 0,4806, respectivamente. Em seqüência, para os loci OarFCB020 e OarCP049 foram obtidos valores de PIC iguais a 0,5722 e 0,6738, respectivamente. Os *loci* que apresentaram maior homozigidade foram os SRCRSP08 e SRCRSP05, apresentando valores de “ f ” iguais a 0,9361 e 0,8901, respectivamente.

Nos dendrogramas abaixo apresentados, observa-se grupos de similaridade genética separados por cor. A figura 4 apresenta o dendrograma da fazenda AE, onde um corte feito em 12 foi suficiente para separar os genótipos encontrados em quatro grupos distintos.

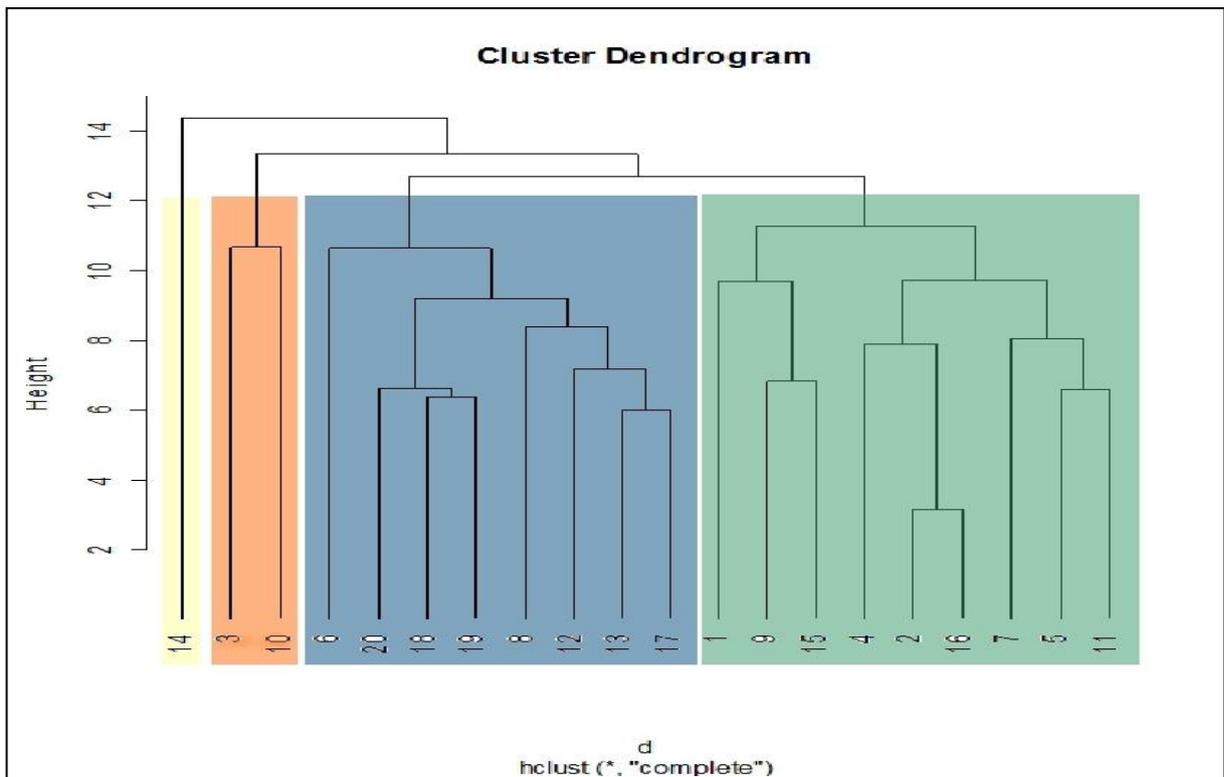


Figura 4 Dendrograma da fazenda AE (localizada em Alegre - ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado.

Destacado em amarelo, o único indivíduo “14”, apresentando uma configuração alélica única distanciando-o dos demais grupos do rebanho.

Destacados em laranja, os indivíduos “3” e “10” foram agrupados juntos por apresentarem a ocorrência dos mesmos dois alelos, aproximando-os geneticamente. Em azul, observa-se um grupo maior de indivíduos com repetição de alelos, obteve-se a ocorrência de onze alelos repetidos. Em verde, também apresentando um agrupamento maior contendo nove indivíduos com maior variabilidade genética entre si, foi observada a ocorrência de 17 alelos diferentes compartilhados entre esses indivíduos. Os animais “2” e “16” compartilham entre si quatro alelos. Com exceção do animal “14”, tal dendrograma mostra grande similaridade genética entre os ovinos Santa Inês, evidenciando baixa variabilidade genética, o que está ligado a acasalamentos entre animais aparentados dentro de um mesmo rebanho.

Na figura 5, observa-se o dendrograma da fazenda GUA, onde um corte aproximadamente em 10,3 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos.

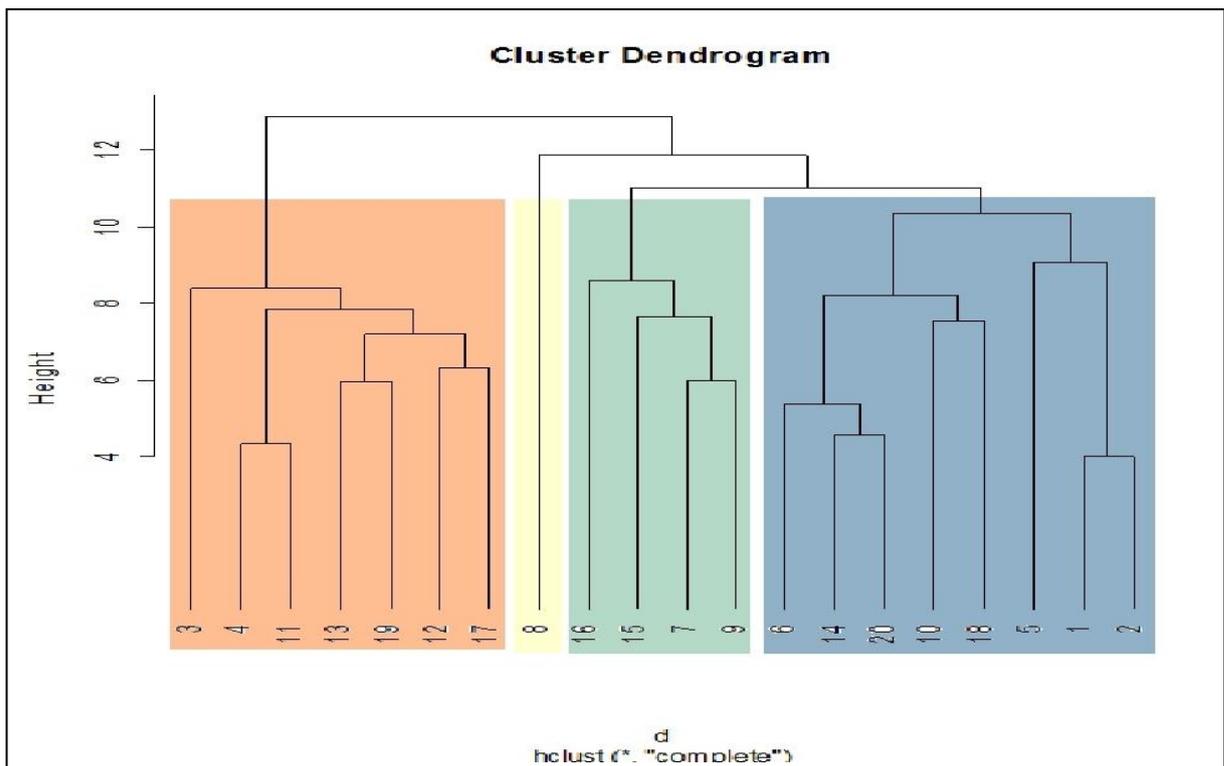


Figura 5 Dendrograma da fazenda GUA (localizada em Guarapari - ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado.

Observa-se que o indivíduo “8”, destacado em amarelo se distanciou geneticamente dos demais. Os indivíduos destacados em verde apresentaram repetição em nove alelos, o que os aproxima geneticamente. Os indivíduos destacados em azul apresentam o maior grupamento visualizado, que por sua vez,

apresentaram doze alelos, sendo o *locus* menos porlimórfico para este rebanho o OarFCB049 e o mais polimórfico o MAF65, com 5 alelos. No grupo destacado em laranja, representando o segundo maior grupamento, observa-se treze alelos díspares. Sendo que os indivíduos “4” e “11” apresentam alto grau de similaridade genética, de acordo com o dendrograma, compartilhando os mesmos alelos em quatro dos *loci* analisados. Por outro lado, o indivíduo “3” encontra-se geneticamente mais distante dos demais deste subgrupo.

Na figura 6, observa-se o dendrograma da fazenda COL, onde um corte aproximadamente em 12,1 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos.

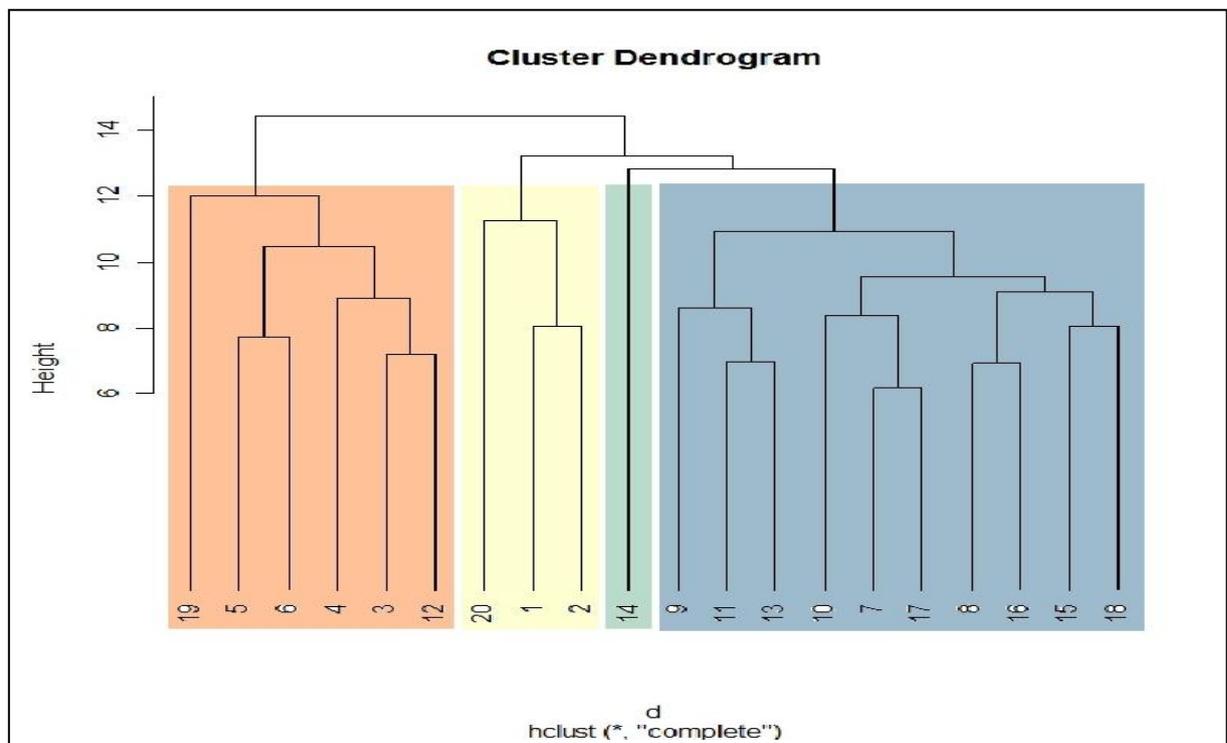


Figura 6 Dendrograma da fazenda COL (localizada em Colatina - ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado.

O grupo destacado em laranja apresentou sete alelos diferentes, contendo um animal (19) distante geneticamente do subgrupo, porém os demais apresentam alto índice de similaridade genética entre si. Em amarelo, são compartilhados cinco alelos distintos, onde os indivíduos “1” e “2” compartilham de quatro alelos, encontrando-se muito próximos geneticamente e o indivíduo “20” diverge compartilhando somente dois alelos do total observado para este grupo. Em verde, o

indivíduo “14” encontra-se distante geneticamente dos demais, compartilhando uma pequena quantidade de alelos. Em azul, um maior agrupamento de indivíduos próximos é evidenciado, podendo-se observar doze alelos diferentes. Para este rebanho, o locus mais polimórfico foi o OarFCB011, apresentando oito alelos, o que pode ser confirmado no dendrograma; e o menos polimórfico foi o SRCRSP08 apresentando apenas um alelo.

Na figura 7 é apresentado o dendrograma da fazenda AZ onde um corte em 12 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos.

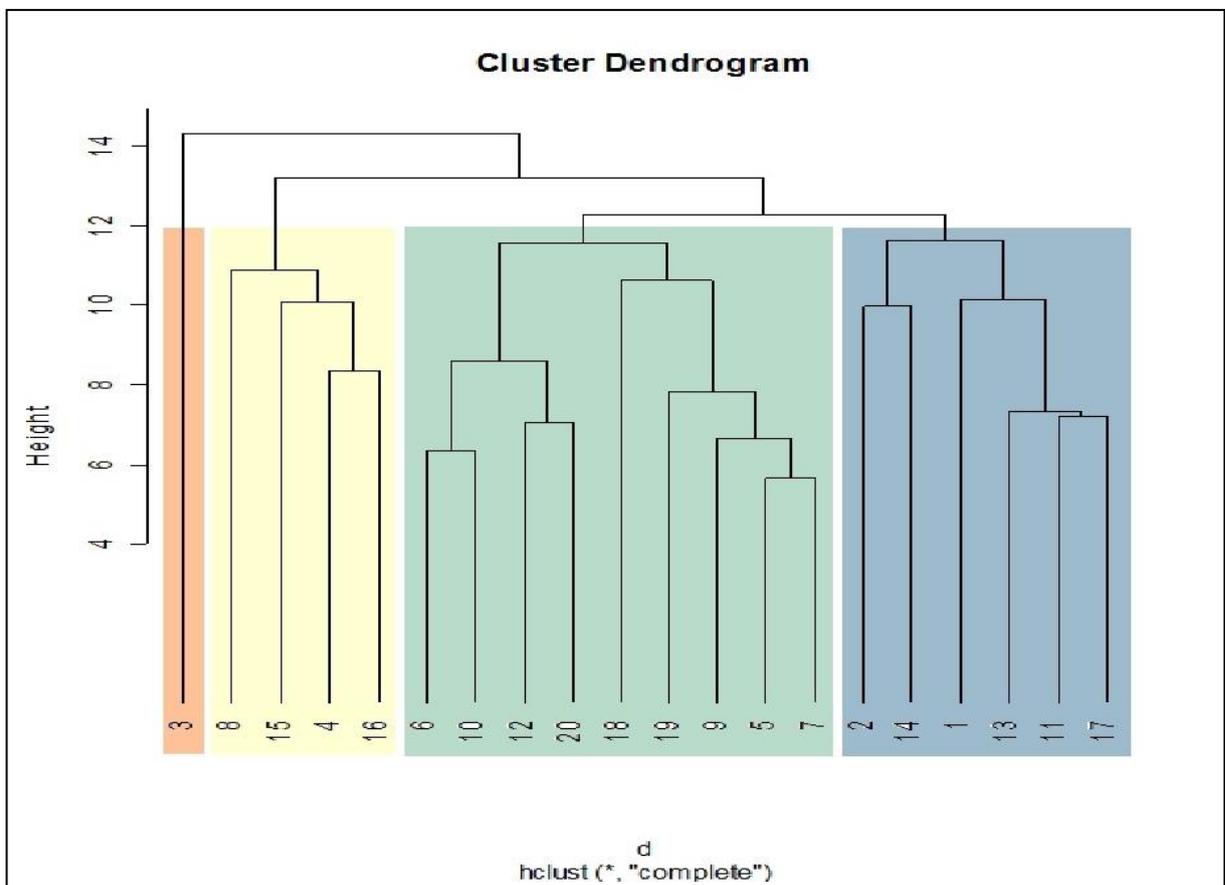


Figura 7 Dendrograma da fazenda AZ (localizada em Guaçuí – ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado.

Em laranja, observa-se um indivíduo distante geneticamente dos demais (3). Em amarelo, é observada a proximidade de quatro indivíduos e o compartilhamento de oito alelos entre si. Destacado em verde, observa-se catorze alelos e todos os indivíduos próximos geneticamente, exceto o indivíduo “18” que compartilha somente quatro alelos com os demais do grupo. Em azul, grande similaridade genética é observada, havendo a presença de sete alelos diferentes. Porém, o

animal “1” compartilha somente de três alelos. Para este rebanho, os *loci* mais polimórficos encontrados foram o OarFCB011 e OarFCB304, onde ambos apresentaram cinco alelos, os loci menos polimórficos foram o OarFCB020 e SRCRSP05, ambos com somente dois alelos observados.

Na figura 8, no dendrograma da fazenda RV, identifica-se que um corte aproximadamente em 11,8 foi o suficiente para separar os genótipos em cinco grupos distintos.

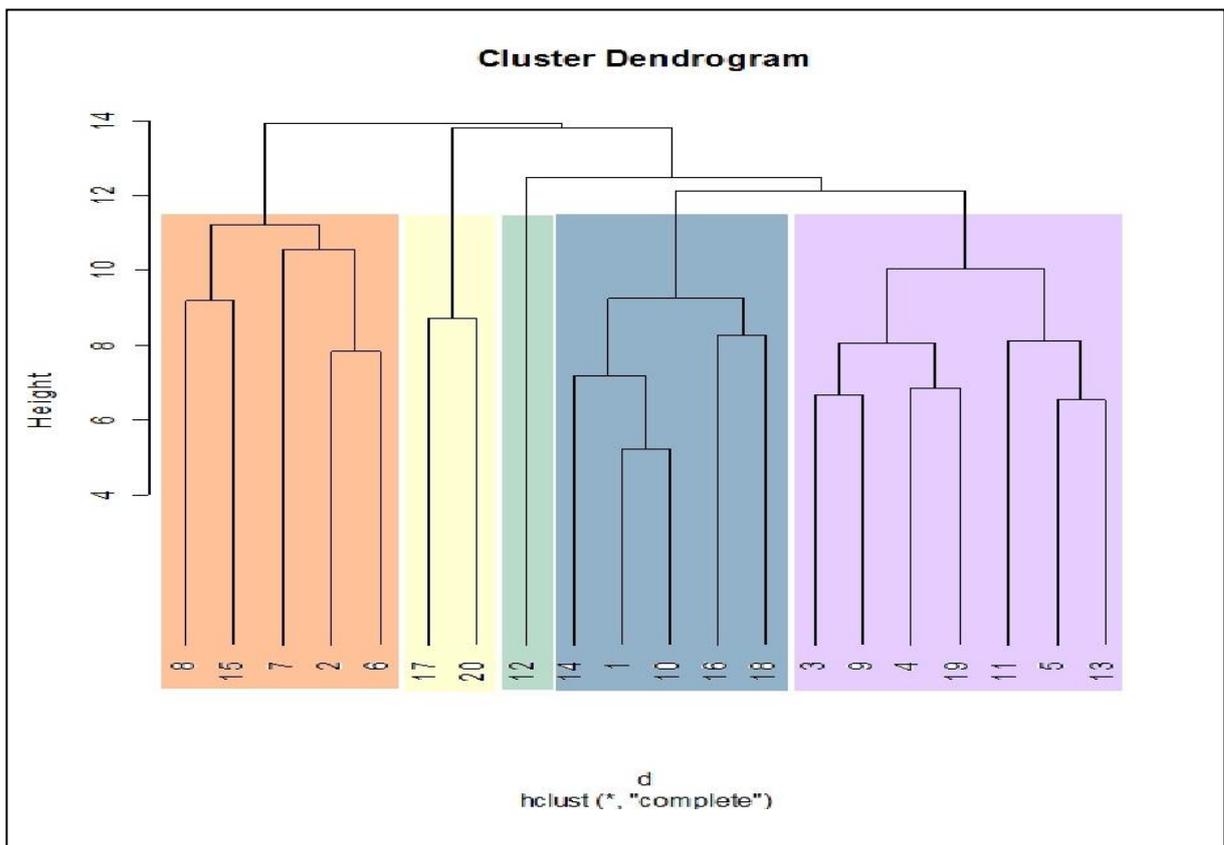


Figura 8 Dendrograma da fazenda RV (localizada em Rive - ES), mostrando 5 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado.

Destacado em laranja, é demonstrado um grupo contendo oito alelos distintos, sendo que os indivíduos “2” e “6” são mais próximos dentro deste grupo. Outro grupo em amarelo se caracteriza apresentando apenas 2 indivíduos que compartilham de três alelos em comum. Em verde, um indivíduo se distanciou geneticamente de todos os demais. Em azul, observou-se oito alelos distintos, apresentando-se um grupo de cinco animais próximos, com exceção do indivíduo “14” que se distanciou num corte em aproximadamente 7,8. Em lilás está demarcado um grupo maior de indivíduos próximos geneticamente, com dez alelos dissimilares, o indivíduo “11” se distancia geneticamente no corte 7,7. Para este rebanho, o *locus*

mais polimórfico foi novamente o OarFCB011 com sete alelos díspares observados e o menos polimórfico foi o SRCRSP05 com somente dois alelos diferentes observados.

Na figura 9, apresenta-se o dendrograma dos animais do rebanho AL onde um corte aproximadamente em 12 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos.

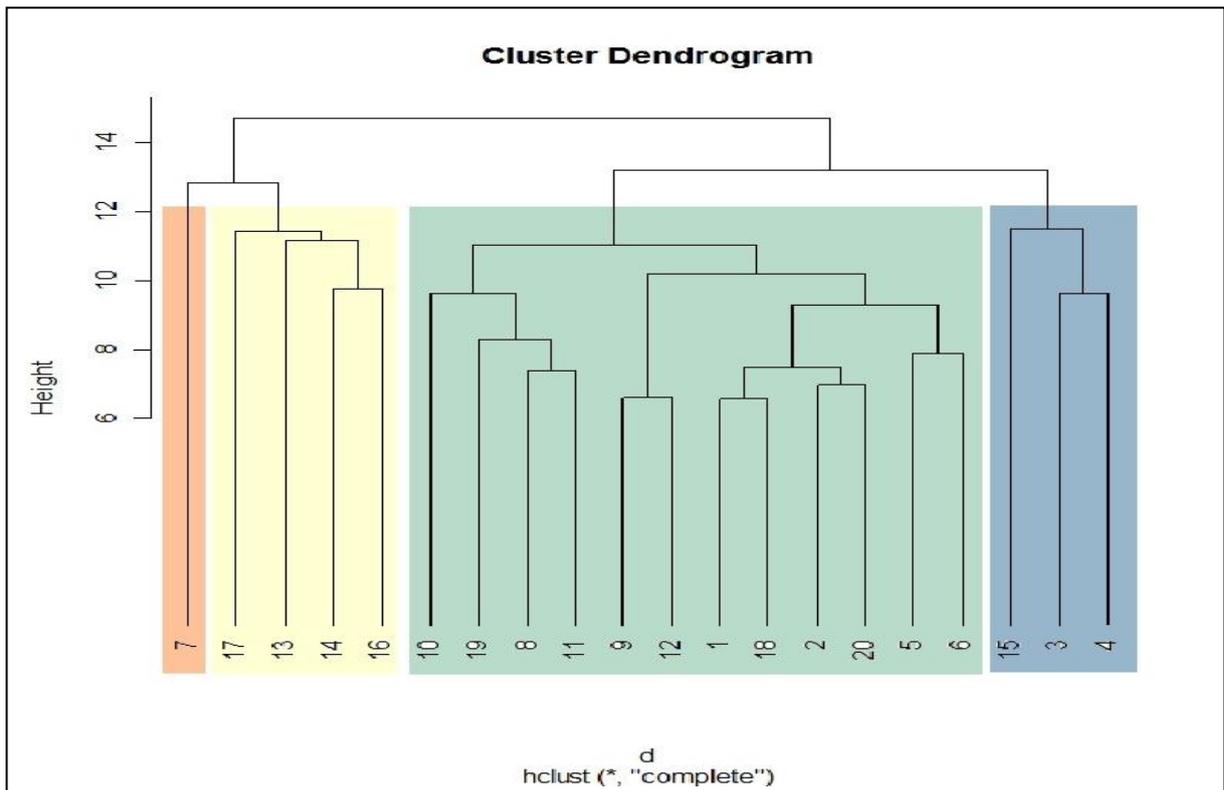


Figura 9 Dendrograma da fazenda AL (localizada em Alegre -ES), mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro do rebanho analisado.

Destacado em laranja, o indivíduo “7” se difere dos demais, estando geneticamente distante. Um grupo é formado (amarelo), apresentando cinco alelos diferentes, com os indivíduos “14” e “16” compartilhando dois alelos. Em verde, encontra-se o maior grupamento de indivíduos geneticamente próximos neste rebanho. Nele, somente os indivíduos “10” e “19” se encontram mais distantes dos demais. Em azul, um pequeno grupo contendo 3 animais é formado e nele observa-se quatro alelos, onde os animais “3” e “4” possuem três alelos em comum e o indivíduo “15” encontra-se mais distantes de ambos. Os *loci* mais polimórficos encontrados para este rebanho foi o OarFCB011 e MAF65, apresentando 5 alelos cada, e os menos polimórficos foram o Oar020 e SRCRSP05, com somente 2 alelos.

7. CONCLUSÃO

Todos os sete marcadores microssatélites utilizados neste trabalho foram adequados para verificar os níveis de heterosigosidade e endogamia para os rebanhos estudados. Os *loci* foram polimórficos e apresentaram baixa diversidade alélica nas fazendas estudadas do sul do estado do Espírito Santo.

Foram encontrados altos valores de coeficiente de endogamia para os *loci* SRCRSP08 e SRCRSP05, demonstrando alta proximidade de parentesco entre os animais das fazendas estudadas. Para os *loci* MAF65, OarFCB304 e OarFCB011 o coeficiente de endogamia apresentou-se menor, entre 0,03778 e 0,4806. Para os demais *loci* estudados os valores de coeficiente de endogamia encontrados variaram de 0,5722 a 0,6738, representando de 57% a 67% níveis de endogamia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Barzinji, Lababidi, S.; Rischkowsky, B.; Al-Rawi, A. A.; Tibbo, M.; Hassen, H.; Baum, M. Assessing genetic diversity of Hamdani sheep breed in Kurdistan region of Iraq using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(67), pp. 15109-15116, 31 October, 2011.
- Alexander, L.J.; Rohrer, G.A.; Beattie, C.W. Cloning and characterization of 414 polymorphic porcine microsatellites. *Animal Genetics*, v.27, n.3, p.137-148, 1996.
- Araújo A.M., Guimarães S.F., Machado T.M., Lopes P.S., Pereira C.S., Silva F.R., Rodrigues M.T., Columbiano V.S., Fonseca C.G. (2006) Genetic Diversity Between Herds Of Alpine And Saanen Dairy Goats And The Naturalized Brazilian Moxoto Breed. *In: Genet. Mol. Biol.* 29(1): 67–74.
- Araújo, A. M., SIMPLÍCIO, A. A. (2000). Melhoramento Genético Em Caprinos E Ovinos No Brasil: Importância Do Padrão Racial. III Simpósio Nacional De Melhoramento Animal.
- Barbosa, O.R.; Silva, R.G.; Sclar, J.Utilização de um índice de conforto térmico em zoneamento bioclimático da ovinocultura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32., 1995, Brasília. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1995. p.131-141.

Barendse, W.; Armitage, S.M.; Kossarek, L.M. A Genetic Linkage Map Of The Bovine Genome. *Nature Genetics*, V.6, N.3, P.227-35, 1994.

Beckmenn, J.S.; Kashi, Y.; Hallerman, E.M. Restriction Fragment Length Polymorphism Among Israeli Holstein-Friesian Dairy Bulls. *Animal Genetics*, V.17, N.1, P.25- 38, 1986.

Benitez D., Cardellino R.A., Sousa W.H. Contribuição do melhoramento genético à produção e qualidade de carne ovina no Brasil. In: *VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal*, São Carlos - SP. 2008.

Borém A., Caixeta E.T. Marcadores Moleculares. 1ª Ed. *Universidade Federal de Viçosa*. 374p, 2006.

Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, H. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331.

Breda F.C., Euclides R.F., Pereira C.S., Torres R. De A., Carneiro P.L.S., Sarmiento R.L., Filho R. De A. T., Moita A.K.F. Endogamia e limite de seleção em populações selecionadas obtidas por simulação. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33: 2017-2025, 2004.

Brito, M. A. A ovinocultura leiteira no Brasil. *Rev. CFMV*, n.39, p.66-69, 2006.

Bueno, M. S.; Cunha, E. A.; Veríssimo, C. J.; Santos, L. E.; Lara, M. A. C.; Oliveira, S. M.; Spósito Filha, E.; Rebouças, M. M. Infecção por nematodos em razas de ovelhas carnicas criadas intensivamente em La región Del sudeste Del Brasil. *Arch. Zootec.*, v.51, p.273-280, 2002.

- Caetano, A. R. Revista Brasileira de Zootecnia Marcadores SNP : conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro
SNP markers : basic concepts , applications in animal breeding and management and perspectives for the future I. v. 3598, 2009.
- Carneiro T.X., Gonçalves E.C., Schneider M.P.C., Silva A. (2007) Diversidade genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59(5): 1257-1262.
- Chardon, P.; Vaiman, M.; Kirszenbaum, M. Restriction Fragment Length Polymorphism Of The Major Histocompatibility Complex Of The Pig. *Immunogenetics* ,V.21, N.2, P.161-71, 1985.
- Coppieters, W.; Van De Weghe, A.; Peelman, L. Characterization Of Porcine Polymorphic Microsatellite Loci. *Animal Genetics*, V.24, N.3, P.163-70, 1993.
- Crispim, A. Et Al. Molecular Markers For Genetic Diversity And Phylogeny Research Of Brazilian Sheep Breeds. V. 11, N. 90, P. 15617-15625, 2012.
- Dornelles, W. J. M. Ovinocultura de lã e carne – uma verdade que voltou a ser evidenciada. *A Hora Veterinária*, ano 22, n.130, p. 6-8, 2002.
- Eding H. (2001) Conservation of genetic diversity: assessing genetic variation using marker estimated kinships. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Wageningen, *Wageningen University*, 79p.
- Egito, A.A., A.S. Mariante E M.S.M. Albuquerque. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. 2002.
- Egito, A. A. De; Albuquerque, M. S.; Mariante, A. da S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. Anais... Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2001. p. 121-126.

Facó, O.; Villela, L. C. V. Conceitos fundamentais do melhoramento genético animal. IN: Campos ACN. (Org.). Do campus para o campo: tecnologias para a produção de ovinos e caprinos, Fortaleza: [s.n.], 2005.

Falconer D.S., Mackay T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics. Harlow: *Longman House*.

FAO. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. Rome.2011; 9:72-73.

Ferreira M.E., Gattapaglia D. Introdução Ao Uso De Marcadores Moleculares Em Análise Genética. 3ª Ed. *Embrapa/Cenargen*, Brasília-Df, 219 P. 1998

Fredholm, M.; Winterø, A.K.; Christensen, K.; et al. Characterization of 24 porcine (dA-dC)n-(dT-dG)n microsatellites: genotyping of unrelated animals from four breeds and linkage studies. *Mammalian Genome*, v.4, n.4, p.187-92, 1993.

Fries, R.; Eggen, A.; Stranzinger, G. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, v.8, n.2, p.403-6, 1990.

Gao LL, Anderson JP, Klingler JP, Nair RM, Edwards OR, Singh KB. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007; 20:82-93.

Garcia, I.F.F.; Pérez, J.R.O.; Oliveira, M.V. (2000). Característica de carcaça de cordeiros Texel x Bergamácia, Texel x Santa Inês puros, terminados em confinamento alimentados com casca de café como parte da dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29 (1), 564-572.barchet

Genes Programa: http://www.ufv.br/dbg/genes/Genes_Br.htm

Georges, M.; Lequarré, A.S.; Hanset, R.; Vassart, G. Genetic variation of the bovine thyroglobulin gene studied at the DNA level. *Animal Genetics*, v.18, n.1, p.41-50, 1987.

Guérin, G.; Bailey, E.; Bernoco, D. The second generation of the International Equine Gene Mapping Workshop half-sibling linkage map. *Animal Genetics*, v.34, n.3, p.161- 168, 2003.

Hopman, T.J.; Han, E.B.; Story, et al. Equine dinucleotide repeat loci COR001-COR020. *Animal Genetics*, v.30, n.3, p.225-226, 1999.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=24&i=P&c=73>>. Acesso em: 20 de julho de 2012.

Johansson, M.; Ellegren, H.; Andersson, L. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *Journal of Heredity*, v.83, n.3, p.196-198, 1992.

Kevorkian, S. E. M.; Georgescu, S. E.; Manea, M. A.; Zaulet, M.; Hermenean, A. O.; Costache, M. Genetic diversity using microsatellite markers in four Romanian autochthonous sheep breeds. *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 15, No. 1, 2010.

Kirkpatrick, B.W.; Bradshaw, M.; Barendse, W.; Dentine, M.R. Development Of Bovine Microsatellite Markers From A Microsatellite-Enriched Library. *Mammalian Genome* , V.6, N.8, P.526-8, 1995.

Leal, S. R.; Quirino, C. R.; Almeida, D. R. F., Corrêa, T. S. C.; Souza, E. S. de S.. Torres, D. S. 2011. Técnica não-invasiva para obtenção de DNA de ovinos (*Ovis aries*): Uma avaliação de métodos. *XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia*. 2011.

Leguiza C.D.P. Marcadores Microsatélites No Mhc De Ovinos: Estudos De Associação E Diversidade Genética Na Raça Santa Inês. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Brasília - DF, *Universidade de Brasília* - (UnB), 84p, 2007.

Lôbo R.N., Sousa W.H. Objetivos E Critérios De Seleção Para A Raça Santa Inês No Brasil. In: *Encontro Nacional De Produção De Caprinos E Ovinos*, 1., Campina Grande. *Anais...*Campina Grande: SEDAP/SEBRAE, P.417, 2006.

Lôbo R.N.B., Lôbo A.M.B.O. Melhoramento Genético Como Ferramenta Para O Crescimento E O Desenvolvimento Da Ovinocultura De Corte. *Revista Brasileira De Reprodução Animal* 31(2): 247-253, 2007.

Macmanus C., Paiva S.R., Araújo R.O. Genetics And Breeding Of Sheep In Brazil. *Revista Brasileira De Zootecnia*, V.39, P-236-246, 2010.

Mariante, A. S.; Ramos, A. F. Criopreservação De Recursos Genéticos Animais Brasileiros. N. Xix, P. 64-68, 2011.

Marsan P.A. and ECONOGENE Consortium (2005) Overview of ECONOGENE, an European project that integrates genetics, socio-economics and geo-statistics for the sustainable conservation of sheep and goat genetic resources. In: The Role of Biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources. Vila Gualino, Turin, Italy, *Book of Proceedings*, p.89-96.

Marklund, S.; Ellegren, H.; Eriksson, S. Parentage Testing And Linkage Analysis In The Horse Using A Set Of Highly Polymorphic Microsatellites. *Animal Genetics*, V.25, N.1, P.19-23, 1994.

Mateus J.C., Eding H., Penedo M.C. Et Al. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Animal Genetics* 35: 305-313, 2004.

Miller, J.R.; Dixon, S.C.; Miller, N.G. A Chromosome 1-Specific Dna Library From The Domestic Pig (*Sus Scrofa Domestica*). *Cytogenetics And Cell Genetics*, V.61, N.2, P.128-31, 1994.

- Moore, S.S.; Byrne, K.; Berger, K.T. Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mammalian Genome*, v.5, n.2, p.84-90, 1994.
- Morais O.R. De. (2007) A Raça Santa Inês, A Carne E Os Cruzamentos Industriais De Ovinos De Corte. Disponível Em: www.farmpoint.com.br. Acesso Em: 21 De Agosto De 2012.
- Murphie, A.M.; Hopman, T.J.; Schug, M.D. Et Al. Equine dinucleotide repeat loci COR021-COR040. *Animal Genetics*, v.30, n.3, p.235-237, 1999.
- Nicholas, F.W. *Introdução À Genética Veterinária*. Porto Alegre: Artmed, 1999. 328p.
- Notter D.R. (1999) The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Animal Science* 77: 61-69.
- Paiva, S. R. Et al. Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. n. 1, p. 887-893, 2005.
- Paiva S.R., Barretto G.B., Souza C.J.H. Uso de marcadores moleculares como ferramenta no manejo reprodutivo de um rebanho de conservação. In: VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, São Carlos – SP, 2008.
- Qwabe, S. O.; Van Marle-Köster, E.; Visser, C. Genetic diversity and population structure of the endangered Namaqua Afrikaner sheep. *Tropical animal health and production*, v. 45, n. 2, p. 511-6, fev. 2013.
- Reed, K.M.; Mendoza, K.M.; Beattie, C.W. Development of 90 new bovine microsatellite loci. *Animal Biotechnology*, v.12, n.1, p.69-76, 2001.
- Regitano L.C.A., Veneroni G.B. Marcadores Moleculares E Suas Aplicações No Melhoramento Animal. In: Simpósio De Biologia Molecular Aplicada À Produção Animal. São Carlos – Sp, 2009.

- Reis, F.A. Atualidades Na Criação De Ovinos No Brasil Central. In: Congresso Internacional Feinco, 5. 2009, São Paulo. Anais... São Paulo: Feinco, 2009. P. 1-14. Cd-Rom.
- Rohrer, G.A.; Alexander, L.J.; Keele, J.W. A Microsatellite Linkage Map Of The Porcine Genome. *Genetics*, V.136, N.1, P.231-45, 1994.
- Rosa, A. J. M., Paiva, S. R. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 35p, 2009.
- Rudbek L., Dissing, J. Rapid Simple Alkaline Extraction Of Human Genomic Dna from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechn.*, 25:588-592, 1998.
- Ruth, L.S.; Hopman, T.J.; Schug, M.D. Equine dinucleotide repeat loci COR041-COR060. *Animal Genetics*, v.30, n.4, p.320-321, 1999.
- Santos, R. Santa Inês: A raça fundamental. Uberaba – MG, Editora Agropecuária Tropical, 568 pag., 2007.
- Santos, F. R., Lacerda, D. R., Redondo, R. A. F., Nascimento, A. M. A., Souza, E. C.-S., Borba, E. L., Ribeiro, R. A., Lovato, M. B. Diversidade Genética. Editora UFMG.
- Souza C.A, Paiva S.R., Mcmanus C.M., Azevedo H.C., Mariante A.S., Grattapaglia D. (2012) Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *In: Genetics Molecular Research*. 11 pg: 1217-1229.
- Simplício, A. A.; Simplício, K. M. M. G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: Desafios e oportunidades. *Rev. CFMV*, n.39, p.07-18, 2006.

Stone, R.T.; Pulido, J.C.; Duyk, G.M. Et Al. A Small-Insert Bovine Genomic Library Highly Enriched For Microsatellite Repeat Sequences. *Mammalian Genome*, V.6, N.10, P.714-24, 1995.

Stone, R.T.; Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Beattie, C.W. Characterization of 109 bovine microsatellites. *Animal Genetics*, v.28, n.1, p.62-66, 1997.

Sulabda I.N., Susari N.N.W., Heryani N.L.G.S., Puja I.K. (2012) Genetic diversity of gembrong goat based on DNA microsatellite markers. *In: Global Veterinaria* 9. Pg 113-116.

Vaiman, D.; Mercier, D.; Moazami-Goudarzi, K. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome*, v.5, n.5, p.288-97, 1994.

Viana J. G. A. (2008). Panorama Geral Da Ovinocultura No Mundo E No Brasil. *Revista Ovinos, Ano 4, N° 12, Porto Alegre, Março De 2008.*

Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.;Tingey, S.V. DNA Polymorphisms Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, V.18, P.6531-6535, 1990.

Yilmaz, O.; Cemal, I.; Karaca, O.; Ata, N.; Sevim, S.; Ozturk, M. Genetic diversity of Karya and Çine Çapari sheep. *Scientific Papers. Series D. Animal Science. Vol. LVI*, 2013.

1
2

9. APÉNDICE

| SAMPLE | ID# | OarFCB020 | OarFCB011 | SRCRSP08 | OarCP049 | SRCRSP05 | MAF65 | OarFCB304 |
|--------|-----|-----------|-----------|----------|----------|----------|-------|-----------|
| AE | 4 | 1/1 | 1/2 | ?? | 4/4 | ?? | 4/4 | 1/1 |
| AE | 20 | 3/3 | 1/2 | ?? | 1/3 | 2/2 | 4/5 | 2/2 |
| AE | 43 | ?? | ?? | ?? | 3/4 | 2/2 | 3/3 | ?? |
| AE | 49 | 3/3 | 2/3 | ?? | 3/5 | 2/2 | ?? | 2/2 |
| AE | 53 | 1/1 | 4/5 | 2/2 | 6/6 | 2/2 | 3/4 | 2/2 |
| AE | 59 | 3/3 | 4/5 | ?? | ?? | 2/2 | 3/5 | 1/1 |
| AE | 69 | 1/1 | ?? | 2/2 | ?? | 2/2 | 4/4 | 2/2 |
| AE | 71 | 3/3 | ?? | ?? | 2/2 | 2/2 | 6/6 | 2/2 |
| AE | 74 | 3/3 | ?? | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 4/5 | 1/1 |
| AE | 80 | 3/3 | ?? | ?? | 3/3 | 2/2 | ?? | ?? |
| AE | 89 | 2/2 | 5/8 | ?? | 4/4 | 2/2 | 4/5 | 2/2 |
| AE | 248 | 1/1 | ?? | ?? | 2/2 | 2/2 | 4/5 | 2/2 |
| AE | 258 | 3/3 | 5/6 | ?? | 2/2 | 1/1 | 3/5 | 2/2 |
| AE | 271 | 3/3 | ?? | 2/2 | ?? | 3/3 | 1/2 | 2/4 |
| AE | 311 | 2/3 | ?? | 3/3 | 2/2 | 2/2 | 4/4 | 1/1 |
| AE | 315 | 2/3 | 1/2 | ?? | 1/1 | 2/2 | 4/5 | 2/2 |
| AE | 317 | 1/1 | 1/3 | ?? | 2/2 | 3/3 | 3/5 | 2/2 |
| AE | 319 | 3/3 | ?? | ?? | 2/5 | 2/3 | 3/3 | 2/2 |
| AE | 368 | 2/2 | ?? | ?? | 2/2 | 2/3 | 3/3 | 2/3 |
| AE | 376 | 2/2 | 3/4 | ?? | 2/4 | 2/2 | 3/3 | 2/2 |
| GUA | 1 | 1/1 | ?? | ?? | 3/3 | 2/2 | 3/5 | 2/2 |
| GUA | 2 | 1/1 | 8/8 | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 3/5 | 2/2 |
| GUA | 3 | 3/3 | 6/7 | ?? | 2/2 | 1/1 | 3/4 | 3/3 |
| GUA | 4 | 1/3 | 6/6 | 1/1 | 2/2 | 3/3 | 4/4 | 2/3 |
| GUA | 5 | 1/3 | 7/8 | ?? | 3/3 | 2/2 | 4/6 | 2/3 |

| SAMPLE | ID# | OarFCB020 | OarFCB011 | SRCRSP08 | OarCP049 | SRCRSP05 | MAF65 | OarFCB304 |
|--------|-----|-----------|-----------|----------|----------|----------|-------|-----------|
| GUA | 6 | 3/3 | 7/7 | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 6/7 | 3/3 |
| GUA | 7 | 1/3 | 7/7 | ?/? | 2/3 | 3/3 | 5/7 | 4/4 |
| GUA | 8 | 2/3 | ?/? | ?/? | 2/3 | 2/3 | ?/? | 2/4 |
| GUA | 9 | 3/3 | 7/7 | 3/3 | 2/3 | 2/3 | 5/5 | ?/? |
| GUA | 10 | 2/3 | ?/? | ?/? | 3/3 | 2/2 | 3/3 | 2/3 |
| GUA | 11 | 1/3 | 6/6 | ?/? | 3/3 | ?/? | 4/4 | 2/3 |
| GUA | 12 | 1/3 | 7/8 | 3/3 | 2/2 | 2/3 | 4/4 | 3/3 |
| GUA | 13 | 2/3 | 6/9 | ?/? | 2/2 | ?/? | 4/4 | 3/3 |
| GUA | 14 | 2/3 | 7/7 | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 3/3 | 2/3 |
| GUA | 15 | 2/3 | 7/7 | 2/2 | 3/3 | ?/? | 4/5 | 3/4 |
| GUA | 16 | 2/3 | ?/? | ?/? | 3/3 | 3/3 | 5/5 | 2/3 |
| GUA | 17 | 2/3 | ?/? | 3/3 | 3/3 | ?/? | 4/4 | 3/3 |
| GUA | 18 | 2/3 | ?/? | 3/3 | 2/2 | ?/? | 3/3 | 3/3 |
| GUA | 19 | 1/1 | ?/? | 3/3 | 2/2 | ?/? | 4/4 | 3/3 |
| GUA | 20 | 3/3 | ?/? | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 3/3 | 3/3 |
| COL | 1 | 1/1 | 1/2 | ?/? | 2/3 | 3/3 | 4/4 | 3/3 |
| COL | 2 | 2/3 | 7/7 | 3/3 | 3/7 | 2/3 | 4/4 | 3/3 |
| COL | 3 | 1/1 | ?/? | ?/? | ?/? | 1/1 | 4/4 | 4/4 |
| COL | 4 | 1/1 | ?/? | 3/3 | ?/? | ?/? | ?/? | 4/4 |
| COL | 5 | 3/3 | ?/? | 3/3 | ?/? | 2/2 | 3/4 | 4/4 |
| COL | 6 | 1/1 | ?/? | 3/3 | ?/? | 2/2 | 3/3 | 4/4 |
| COL | 7 | 1/3 | 5/5 | ?/? | 2/2 | 2/2 | 4/4 | 4/4 |
| COL | 8 | 1/3 | 6/6 | ?/? | 2/2 | 2/2 | 4/5 | 2/3 |
| COL | 9 | 2/3 | ?/? | ?/? | ?/? | 2/2 | 3/5 | 3/4 |
| COL | 10 | 1/1 | 8/8 | ?/? | 2/2 | 2/2 | 3/5 | 3/4 |
| COL | 11 | 2/3 | 8/8 | ?/? | 1/1 | 2/2 | ?/? | 3/5 |
| COL | 12 | 1/1 | ?/? | ?/? | 3/3 | 1/1 | 3/3 | 4/4 |
| COL | 13 | 2/3 | ?/? | 3/3 | ?/? | 2/2 | ?/? | 3/5 |

| SAMPLE | ID# | OarFCB020 | OarFCB011 | SRCRSP08 | OarCP049 | SRCRSP05 | MAF65 | OarFCB304 |
|--------|-----|-----------|-----------|----------|----------|----------|-------|-----------|
| COL | 14 | 1/1 | ?/? | 3/3 | ?/? | ?/? | ?/? | 3/4 |
| COL | 15 | 3/3 | 2/2 | ?/? | 2/2 | ?/? | ?/? | 3/4 |
| COL | 16 | 1/3 | ?/? | 3/3 | 2/2 | ?/? | ?/? | 2/3 |
| COL | 17 | 3/3 | ?/? | 3/3 | 2/2 | 2/2 | ?/? | 4/4 |
| COL | 18 | 2/3 | ?/? | 3/3 | 2/2 | 1/1 | ?/? | 3/4 |
| COL | 19 | 2/2 | 3/4 | ?/? | ?/? | ?/? | ?/? | 4/4 |
| COL | 20 | 1/1 | ?/? | ?/? | ?/? | 1/1 | ?/? | 3/3 |
| AZ | 2 | 3/3 | 3/4 | 3/3 | ?/? | ?/? | ?/? | 2/3 |
| AZ | 10 | 3/3 | ?/? | 3/3 | ?/? | ?/? | ?/? | 3/4 |
| AZ | 11 | ?/? | 6/6 | ?/? | ?/? | ?/? | 3/3 | 2/3 |
| AZ | 12 | 3/3 | ?/? | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 3/3 | 2/3 |
| AZ | 13 | 3/3 | 6/7 | 2/2 | 2/4 | 2/2 | 4/4 | 3/3 |
| AZ | 15 | 2/2 | ?/? | 3/3 | 3/3 | 1/1 | 4/4 | 4/4 |
| AZ | 16 | ?/? | 6/6 | 3/3 | 4/4 | 2/2 | 4/4 | 3/3 |
| AZ | 107 | 3/3 | ?/? | 4/4 | ?/? | 2/2 | 8/8 | 3/4 |
| AZ | 202 | 3/3 | 6/7 | 3/3 | 1/1 | ?/? | 4/4 | 3/6 |
| AZ | 222 | 2/2 | ?/? | 3/3 | ?/? | 1/1 | 4/4 | 3/4 |
| AZ | 421 | 3/3 | ?/? | 3/3 | ?/? | 1/1 | 5/5 | 2/3 |
| AZ | 444 | 3/3 | 4/5 | 4/4 | ?/? | 1/1 | 4/4 | 4/4 |
| AZ | 508 | 3/3 | ?/? | 3/3 | ?/? | ?/? | 5/5 | 3/4 |
| AZ | 524 | 3/3 | 5/6 | 3/3 | ?/? | 1/1 | ?/? | 3/4 |
| AZ | 554 | 3/3 | ?/? | 2/2 | ?/? | 1/1 | ?/? | 3/4 |
| AZ | 628 | 3/3 | ?/? | 2/2 | ?/? | 2/2 | ?/? | 3/4 |
| AZ | 676 | 3/3 | 7/7 | 3/3 | ?/? | 2/2 | 5/5 | 3/3 |
| AZ | 727 | 3/2 | ?/? | 3/3 | ?/? | 1/1 | ?/? | 3/3 |
| AZ | 753 | 3/3 | 5/5 | 3/3 | ?/? | 2/2 | 4/4 | 3/5 |
| AZ | 806 | 3/3 | ?/? | 3/3 | ?/? | 2/2 | 4/4 | 4/4 |
| RIVE | 1 | 3/3 | 7/7 | 1/3 | 4/4 | 1/1 | 4/4 | 4/4 |

| SAMPLE | ID# | OarFCB020 | OarFCB011 | SRCRSP08 | OarCP049 | SRCRSP05 | MAF65 | OarFCB304 |
|--------|-----|-----------|-----------|----------|----------|----------|-------|-----------|
| RIVE | 2 | 3/3 | 3/8 | ?? | ?? | 1/1 | 4/6 | 3/3 |
| RIVE | 3 | 3/3 | ?? | 2/3 | ?? | 1/1 | 4/5 | 4/4 |
| RIVE | 4 | 2/3 | 1/1 | 3/3 | 2/2 | 2/2 | 4/4 | 4/4 |
| RIVE | 5 | 3/3 | ?? | ?? | 3/3 | 2/2 | 4/5 | 2/3 |
| RIVE | 6 | 3/3 | ?? | ?? | ?? | 1/1 | 4/6 | 3/4 |
| RIVE | 7 | 3/3 | ?? | ?? | ?? | 2/2 | 6/7 | 3/4 |
| RIVE | 8 | ?? | 6/6 | ?? | ?? | 2/2 | 4/6 | 3/5 |
| RIVE | 9 | 3/3 | 7/8 | ?? | ?? | 2/2 | 4/5 | 4/4 |
| RIVE | 10 | 3/3 | 7/7 | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 4/4 | 3/5 |
| RIVE | 11 | 3/3 | ?? | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 2/2 | 3/4 |
| RIVE | 12 | 3/3 | ?? | 4/4 | ?? | 1/1 | 3/5 | 3/4 |
| RIVE | 14 | 3/3 | ?? | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 4/4 | 2/3 |
| RIVE | 19 | 3/3 | 6/9 | ?? | ?? | 1/1 | 4/4 | 4/4 |
| RIVE | 35 | ?? | 9/10 | ?? | 1/1 | 2/2 | 4/6 | 3/4 |
| RIVE | 49 | 1/1 | 9/10 | ?? | 2/4 | 1/1 | 4/4 | 3/3 |
| RIVE | 171 | ?? | 6/6 | ?? | 4/4 | 2/2 | 3/3 | 3/3 |
| RIVE | 177 | ?? | ?? | 3/3 | ?? | 1/1 | 4/4 | 3/5 |
| RIVE | 182 | ?? | ?? | 3/3 | ?? | 2/2 | 4/5 | 4/4 |
| RIVE | 185 | 1/1 | ?? | 3/3 | ?? | 1/1 | 3/3 | 3/3 |
| AL | 1 | 1/1 | 6/6 | 3/3 | ?? | 2/2 | 4/4 | 2/2 |
| AL | 100 | ?? | ?? | 3/3 | 4/4 | 1/1 | 4/4 | 2/3 |
| AL | 2 | ?? | ?? | ?? | 2/4 | 2/2 | 4/6 | 1/1 |
| AL | 3 | ?? | ?? | ?? | 2/2 | 2/2 | 4/5 | 4/4 |
| AL | 5 | 1/4 | ?? | ?? | ?? | 2/2 | 4/4 | 3/4 |
| AL | 6 | ?? | ?? | 2/2 | ?? | 2/2 | 4/4 | 2/4 |
| AL | 7 | 1/1 | ?? | 4/4 | 2/2 | 1/1 | ?? | 2/2 |
| AL | 8 | 1/1 | ?? | ?? | ?? | 2/2 | 4/4 | 3/3 |
| AL | 9 | 1/1 | ?? | 3/3 | ?? | 1/1 | 4/4 | 4/4 |

| SAMPLE | ID# | OarFCB020 | OarFCB011 | SRCRSP08 | OarCP049 | SRCRSP05 | MAF65 | OarFCB304 |
|--------|------|-----------|-----------|----------|----------|----------|-------|-----------|
| AL | 10 | 1/4 | 4/4 | ?/? | 2/5 | 2/2 | 4/4 | ?/? |
| AL | 11 | 1/1 | 4/4 | 2/2 | ?/? | 2/2 | 4/6 | 3/3 |
| AL | 12 | 1/1 | 2/4 | 3/3 | ?/? | 1/1 | 4/4 | ?/? |
| AL | 13 | 1/1 | 5/6 | ?/? | 1/1 | 1/1 | 6/6 | 3/5 |
| AL | 54 | 1/1 | 3/5 | 3/3 | ?/? | 2/2 | 3/3 | ?/? |
| AL | 63 | ?/? | ?/? | ?/? | ?/? | 2/2 | 4/6 | ?/? |
| AL | 73 | 1/1 | ?/? | 3/3 | ?/? | ?/? | 7/7 | 2/3 |
| AL | 87 | 1/1 | 4/4 | ?/? | ?/? | 1/1 | 3/3 | ?/? |
| AL | 90 | 1/1 | 5/6 | 2/2 | 3/4 | 2/2 | 4/4 | 2/3 |
| AL | 92 | ?/? | 3/4 | 1/1 | ?/? | 1/1 | 4/4 | 3/3 |
| AL | 1000 | ?/? | 3/5 | 3/3 | 3/4 | 2/2 | 4/4 | ?/? |