

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

THIAGO DA SILVA CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS DA REGIÃO
NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES

Campos dos Goytacazes
2013

THIAGO DA SILVA CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS DA REGIÃO
NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO 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 produção animal na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

ORIENTADORA: Professora Celia Raquel Quirino

Campos dos Goytacazes
2013

THIAGO DA SILVA CORRÊA

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS DA REGIÃO
NORTE DO ESTADO DO RIO DEJANEIRO 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 produção animal na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios – UENF

Dra. Aline Pacheco - UENF

Dra. Aparecida de Fátima Madella de Oliveira - IFES

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Salvador Fernandes Corrêa e Lúcia Ferraz da Silva Corrêa por serem o significado primordial de amor em minha vida, a fortaleza, a proteção e o abrigo.

Agradeço aos meus irmãos Rodrigo da Silva Corrêa e Ciro da Silva Corrêa por serem além de minha família, meus amigos e companheiros em muitas batalhas. Por sermos um time (que muitas vezes diverge entre si, mas que não pensa duas vezes em se unir para defender qualquer um da família incondicionalmente).

Agradeço à minha esposa Érica Santana Siqueira, a minha alma gêmea que tive a oportunidade de conhecer tão cedo e que me trouxe muito do que sou. A pessoa que está sempre do meu lado, me dando apoio e me dando coerência, me levantando em momentos de desânimo e me segurando em momentos de exaltação. Meu equilíbrio, meu amor.

Agradeço aos meus queridos amigos, tenho orgulho de serem tantos que não cabem aqui. São a minha família também e eu sei que eles sentem o mesmo por mim.

Agradeço à Professora Celia Raquel Quirino que me impulsionou e permitiu que esse mestrado pudesse ser feito e concluído, me dando as condições de me tornar um profissional melhor e propiciando ainda oportunidades de continuar a evoluir, lutando sempre em nome de nosso grupo de trabalho.

Agradeço ao meu grupo de trabalho na UENF, que mesmo em constante mudança é sempre constituído de ótimas pessoas.

Agradeço a Aline Pacheco por ter me ajudado sempre que precisei, de forma imediata, propiciando que meu trabalho pudesse ser melhor.

Agradeço a Steven Ribeiro Leal por um amigo e um ótimo profissional, me ajudando inúmeras vezes nesse trabalho a qualquer hora, estando sempre disponível a tirar dúvidas.

Agradeço aos amigos Dayana Rangel Falcão, Aylton Bartholazi, Amanda Azevedo, Mariana Ribeiro, Aline Pacheco e toda a equipe de trabalho do LRMGA por ser um grupo realmente muito agradável de se trabalhar e pela ótima parceria.

*“Amor é a lei,
Amor sob vontade.”*

Lei de Thelema

SUMÁRIO

Resumo.....	8
Abstract.....	9
1. Introdução.....	10
2. Objetivo geral.....	13
3. Revisão Bibliográfica.....	14
3.1 A ovinocultura no Brasil.....	14
3.2 Marcadores Moleculares.....	17
3.3 Utilização de marcadores microssatélites para estudos de diversidade genética.....	18
4. Material e Métodos.....	22
4.1 Amostragem e extração de DNA.....	22
4.2 PCR e genotipagem dos <i>loci</i> de microssatélites.....	23
4.3 Análise estatística dos dados.....	26
5. Resultados e discussão.....	28
6. Conclusão.....	40
7. Referências.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Informações sobre os <i>loci</i> estudados.....	24
Tabela 2 Número de alelos de cada <i>locus</i> em cada população de ovinos Santa Inês do norte do estado do Rio de Janeiro.....	28
Tabela 3 Comparação entre número de alelos encontrados de 4 <i>loci</i> por Roberts et al. (2003) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro.....	29
Tabela 4 Comparação entre número de alelos encontrados de 4 <i>loci</i> por Kevorkian et al. (2003) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro.....	30
Tabela 5 Comparação entre número de alelos encontrados de 5 <i>loci</i> por Qwabe et al. (2013) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro.....	31
Tabela 6 Diversidade alélica, Heterozigosidade observada, Heterozigosidade esperada, Conteúdo de informação polimórfica e Coeficiente de endogamia dos <i>loci</i> estudados.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Bandas visualizadas após corrida eletroforética capilar do <i>locus</i> SRCRSP05.....	25
Figura 2 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um heterozigoto.....	26
Figura 3 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um homozigoto.	26
Figura 4 Dendrograma da fazenda CJ do norte do estado do Rio de Janeiro mostrando 5 grupos de similaridade genética dentro da população analisada.....	32
Figura 5 Dendrograma da fazenda LC do norte do estado do Rio de Janeiro mostrando 2 grupos de similaridade genética dentro da população analisada.....	33
Figura 6 Dendrograma da fazenda SC do norte do estado do Rio de Janeiro mostrando 4 grupos de similaridade genética dentro da população analisada.....	33
Figura 7 Dendrograma da fazenda SF do norte do estado do Rio de Janeiro mostrando 2 grupos de similaridade genética dentro da população analisada.....	34
Figura 8 Dendrograma da fazenda SJB do norte do estado do Rio de Janeiro mostrando 2 grupos de similaridade genética dentro da população analisada.....	36
Figura 9 Dendrograma da fazenda UENF do norte do estado do Rio de Janeiro mostrando 4 grupos de similaridade genética dentro da população analisada.....	37

RESUMO

Como forma de iniciar um programa de conservação e melhoramento das raças de ovinos no Brasil, é necessário um conhecimento dos padrões de diversidade genética existentes entre e dentro das raças. Assim, o presente trabalho teve como finalidade avaliar a variabilidade genética de rebanhos da raça Santa Inês do norte do Estado do Rio de Janeiro a partir do uso de marcadores microssatélites. Foram analisados 120 animais de seis fazendas, sendo estudados 10 *loci* microssatélites para cada um dos animais totalizando 1200 amostras. A diversidade alélica por *locus* variou de 3 à 9. Nove loci analisados mostraram-se polimórficos, a exceção do *locus* SRCRSP08 que não mostrou nenhum alelo. A Heterozigose média observada foi baixa (média de 0,20), mas a heterozigosidade esperada variou de 0,44 à 0,85, com média de 0,59. O PIC variou de 0,40 à 0,84 com média de 0,55 e a média do coeficiente de endogamia foi 0,50 com o máximo de 0,88. Conclui-se que a diversidade genética dessa população é baixa e sugere-se que os futuros acasalamentos sejam entre animais menos aparentados para prevenir a ocorrência de efeitos genéticos indesejáveis causados pela depressão endogâmica.

Palavras chave: heterosigosidade, homossigose, marcadores moleculares, Santa Inês.

ABSTRACT

How a form to start a conservation and improvement program of the sheep breeds in Brazil, is necessary a minimum knowledge of the patterns of genetic diversity who existing within and between the breeds. This work was the objective to evaluate the genetic variability of the Santa Inês herds in the Rio de Janeiro state with microsatellites markers. Were analyzed 120 animals of 6 different farms, 10 microsatellites loci were studied to each animal totaling 1200 samples. The effective number of alleles per locus ranged 3 to 9. Nine microsatellite loci analyzed in this study showed polymorphism, with the exception of locus SRCRSP08 which showed no amplification in PCR and no allele were observed. The average observed heterozygosity was low (average of 0.20), but espered heterozygosity ranged from 0.44 to 0.85, with average of 0.59. The PIC varied from 0.40 to 0.84 with average of 0.55 and the average inbreeding coefficient was 0.50 with the maximum of 0.88. It's conclude that the genetic diversity of this animal population is low and the future mating's should be make between the animals with low or no parentage in order to prevent the occurrence of undesirable genetic effects caused by inbreeding depression.

Keywords: heterosigosity, homosigosity, molecular markers, Santa Inês

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui várias raças de animais domésticos que se desenvolveram a partir de outras raças trazidas pelos portugueses e outros povos para o continente sulamericano, sendo introduzidas no Brasil pelo Paraguai e pela Argentina (MCMANUS, 2010). Estes animais se adaptaram aos mais variados ambientes brasileiros e hoje são conhecidos como raças naturalizadas, locais ou localmente adaptadas (PAIVA, 2008). Hoje, grande parte destes rebanhos encontra-se ameaçado de extinção, principalmente em razão de cruzamentos absorventes indiscriminados com animais de raças exóticas/modernas que passaram a ser importadas a partir do final do século XIX e início do século XX (MORAIS, 2001).

Levantamentos realizados sob a coordenação da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) têm mostrado que existe uma grande quantidade de raças ameaçadas de extinção em todo o mundo (FAO, 2001). O sistema de informações sobre a Diversidade de Animais Domésticos (DAD-IS) da FAO comprovou que há uma taxa de extinção, a nível mundial, de 48 raças ao ano, próximo à perda de uma raça a cada semana. Estimativas da FAO (2001) indicaram que cerca de 30% das 3.882 raças de animais domésticos existentes estão em vias de extinção.

As raças ovinas naturalizadas brasileiras, como por exemplo, a Santa Inês, se destacam 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 estas raças os atributos necessários para classificá-las como detentoras de recursos genéticos importantes para uso futuro (LEGUIZA, 2007).

Como consequência da demanda comercial, em muitos países, inclusive no Brasil, as raças locais de ovinos são parcialmente substituídas por raças comerciais exóticas (CALVO et al., 2005; LÔBO e LÔBO, 2007; BENITEZ et al., 2008; GIZAW et al., 2008). As propostas de substituição ou modificação de genótipos existentes deveriam estar precedidas de uma exaustiva análise das suas consequências biológicas e socioeconômicas no sistema de produção (MUELLER, 1996).

A manutenção das raças naturalizadas de ovinos brasileiros depende diretamente de sua inserção nos sistemas de produção existentes. Para que isto aconteça, é necessário identificar 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). Adicionalmente, a sobrevivência destas raças irá permitir que no futuro, estas 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).

Atualmente os recursos genéticos nativos de ovinos representam uma grande fonte de renda e um grande valor cultural para muitos países, principalmente para os membros da Comunidade Européia. Em tais países foi iniciado 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). Atualmente, a América do Sul é uma das regiões com grande potencial para crescimento da ovinocultura de maneira competitiva frente ao mercado mundial. Contudo, existe 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. A ovinocultura no Brasil é um grande potencial a ser explorado e que pode ser muito melhor aproveitado se forem realizados trabalhos de caracterização e conscientização da população acerca das raças naturalizadas (PAIVA, 2005).

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente rebanhos da raça Santa Inês do norte do estado do Rio de Janeiro a partir do uso de marcadores microssatélites.

2.1 Objetivos específicos

Caracterizar geneticamente rebanhos de ovinos da Raça Santa Inês de fazendas do norte do estado do Rio de Janeiro a partir do estudo de 10 *locus* Microssatélites.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A ovinocultura no Brasil

A criação de ovinos ao redor do mundo tem tido grande importância ao longo da história. Com ampla distribuição pelo globo terrestre, os ovinos povoam desde regiões quentes e desérticas até regiões frias e úmidas, planícies e montanhas, e têm contribuído para o desenvolvimento de vários povos. No Brasil, no entanto, questões sócio-culturais deram à ovinocultura uma condição de atividade de categoria inferior. Sob esta visão preconceituosa, os ovinos foram por muito tempo criados somente para o consumo nas fazendas, tanto da carne como da lã, peles e pelegos. Mesmo nos tempos áureos da produção de lã, quando o Rio Grande do Sul destacou-se pela criação de grandes cooperativas chamadas “cooperativas laneiras”, a criação de ovinos era praticada sem grande elaboração tecnológica (MORAIS, 2001).

Este descaso fez com que os produtos brasileiros derivados de ovinos (lã, carne, pele) perdessem competitividade frente aos produtores de outros países, que por sua vez, avançaram grandemente no campo do melhoramento genético de características de produção, bem como na conservação de seus estoques de raças naturais (MORAIS, 2001).

Para que ocorra uma mudança deste cenário, é necessária uma profunda modificação logística de todas as classes envolvidas na produção de ovinos, ou seja, desde o pesquisador até o produtor. Tal atitude é válida, visto que os ovinos representam uma fonte de recursos importantes do ponto de vista social, ecológico, econômico, cultural e histórico (PAIVA, 2005).

De acordo com McManus et al. (2010), os ovinos estiveram presentes no Brasil há cerca de 500 anos, porém, sempre sendo utilizados como grupo secundário no interesse dos criadores e grupos de pesquisa.

Atualmente o Brasil apresenta várias raças de ovinos que podem ser divididas em raças naturalizadas ou comerciais/exóticas (recentemente introduzidas no país). As raças naturalizadas de ovinos brasileiras são, em geral, animais de pequeno porte, e, até o momento, foram submetidos a baixas taxas de seleção artificial e melhoramento genético, sendo pouco especializadas na produção intensiva de leite e/ou carne. Possuem, em geral, alta resistência às doenças e parasitas (PAIVA, 2005). O aproveitamento de raças locais adaptadas a condições específicas pode ser uma boa alternativa devido a sua rusticidade (MEXIA, 2012).

A raça nordestina Santa Inês, segundo o IBGE (2010), está presente predominantemente no Nordeste (56,72% da população), seguida da região Sul do Brasil, com 28,11%. Trata-se de uma raça desprovida de lã (deslanada), sendo, provavelmente, produto de cruzamentos entre raças africanas e européias trazidas no período da colonização. O potencial para a produção de carne da raça Santa Inês é bom, porém, necessita de intenso trabalho de seleção. A pele é de excelente qualidade, merecendo também atenção dos melhoristas. As fêmeas não apresentam estacionalidade reprodutiva, ao contrário da maioria das raças européias (MORAIS, 2001).

Limitações que se reconhecem na raça Santa Inês têm incidido na necessidade de melhorar suas características de carcaça (SOUSA et al., 2006), sua conversão alimentar, habilidade materna, prolificidade e características de eficiência reprodutiva em geral (MORAIS e ALBUQUERQUE, 2006; LÔBO e SOUSA, 2006). Ameaçados de extinção até cerca de vinte anos, o rebanho Santa Inês é o que mais cresce no Brasil atualmente. A grande ameaça a esta raça é a política de registro genealógico, que fechou o livro de machos no ano 2000 com poucos animais registrados, com isso, a consanguinidade vem aumentando rapidamente nos rebanhos chamados “elite” (MORAIS, 2001). Além disso, as populações de

genótipos nativos da raça Santa Inês, a maioria delas em mãos de pequenos criadores de escassos recursos financeiros e infra-estrutura e sem a imprescindível assistência técnica, têm perdido espaço, gradativamente, para acasalamentos muito diversos, produto da falta de manejo e, portanto, sem o mínimo planejamento técnico (BENITEZ et al., 2008).

O início dos anos 90 foi marcado por uma grande crise mundial no mercado da lã e a já combalida produção laneira nacional entrou em processo de desaparecimento. Diante de tal crise, a ovinocultura de corte brasileira iniciou sua ascensão. Atualmente, o polo da ovinocultura nacional é a região Nordeste. A raça que mais vem se destacando nesse crescimento é a Santa Inês.

Há mais de uma década que a raça Santa Inês atravessa um momento comercial excepcional. Esta raça ocupa um lugar preponderante na pecuária nacional, com expansão rápida em grande parte do território nacional, criando desta forma uma demanda crescente.

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.

Enquanto as vantagens dos produtos provenientes dos ovinos são bem consideráveis atualmente, os mesmo, exportados pelo Brasil, são geralmente negligenciados. Esse fato torna-se mais relevante quando os níveis de importação de couro/pele e lã (de países como a Austrália, países da África e do Oriente Médio) e carne (do Uruguai) pelo Brasil são elevados (MAPA, 2009).

O Brasil tem sem dúvida o potencial para ser um grande produtor de carne ovina de excelente qualidade, competitiva a nível internacional, e com capacidade de concorrer no mercado nacional com as carnes das outras espécies. Por sua vez, o melhoramento genético tem o potencial para contribuir de forma substancial ao desenvolvimento da ovinocultura de corte. Contudo, para que os benefícios do melhoramento genético sejam substanciais, é necessário que algumas condições mínimas sejam atendidas. Dentre tais condições, uma das mais importantes, sem dúvida, é o conhecimento dos genótipos, e quais têm maior distribuição no país. O

conhecimento que se tem em relação a estes genótipos é produto de pesquisas com grupos de animais de tamanho limitado, e não do acúmulo de informações de populações realmente representativas de tais genótipos (BENITEZ et al., 2008).

A ausência de um controle zootécnico adequado na maior parte dos rebanhos é outro fator que impossibilita a execução de programas de melhoramento genético. A carência de bancos de dados produtivos confiáveis e seguros também dificulta a realização de pesquisas para o setor. Desta forma, é fundamental que a ovinocultura brasileira passe a adotar uma escrituração zootécnica rigorosa e bem estabelecida. A escrituração zootécnica compreende as anotações de controle do rebanho, com fichas individuais para cada animal, contendo sua genealogia, ocorrências e desempenho. Estas anotações devem englobar o máximo de informações possíveis, pois quanto mais detalhadas forem estas anotações, maiores serão os benefícios que delas poderão ser extraídos (LÔBO e LÔBO, 2007).

3.2 Marcadores Moleculares

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

Desde a redescoberta dos princípios de Mendel, no início do século XX, o foco da atenção dos geneticistas passou a ser o gene como unidade fundamental da variação biológica. Com o desenvolvimento da genética de populações, surgiu o conceito de utilização de genes individuais como marcadores, com a finalidade de fazer inferências sobre as características de uma população, tais como conteúdo de variabilidade, os padrões de migração, a seleção e a deriva genética (REGITANO e VENERONI, 2009). Marcador molecular pode ser considerado qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Quando os marcadores moleculares apresentam um comportamento Mendeliano simples, eles podem ser empregados como marcadores genéticos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Também denominados marcadores de proteínas, ou marcadores bioquímicos, os marcadores moleculares tem sido utilizados em inúmeras pesquisas (LEGUIZA, 2007).

De acordo com Borém e Caixeta (2006), marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética. Algumas sequências específicas de DNA, tipos sanguíneos e isoenzimas são marcadores moleculares (PEREIRA, 2012).

Com o desenvolvimento das técnicas de análise de material genético, a possibilidade de analisar variações individuais nas sequências de DNA, independentemente de corresponderem a um peptídeo ou não, permitiu o desenvolvimento de diversos tipos de marcadores moleculares. Nesse caso, cada segmento de DNA constitui um locus e os padrões correspondentes às variações de sequência nesse segmento são fenótipos moleculares. A utilização de muitos desses marcadores baseia-se na técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), que permitiu a automação e a simplificação das etapas de obtenção dos padrões moleculares. Nessa técnica, segmentos de DNA específicos são replicados *in vitro* e isso resulta na produção de milhares de cópias da sequência desejada, em quantidade suficiente para permitir a pronta visualização do DNA, sem a necessidade de métodos indiretos (REGITANO e VENERONI, 2009).

Os tipos de marcadores moleculares revelam variações de sequência oriundas de diferentes mecanismos de mutação e a escolha do tipo de marcador a ser utilizado depende essencialmente da aplicação. Deve-se levar em conta a dificuldade técnica, custo para obtenção do número necessário de genótipos, informatividade, distribuição pelo genoma e o tipo de interação alélica (REGITANO e VENERONI, 2009).

3.3 Utilização de marcadores microssatélites para estudos de diversidade genética

Marcadores microssatélites, também denominados STR (*Short Tandem Repeat* - Repetições Curtas em Tandem), SSRP (*Simple Sequence Repeat Polymorphism* - Polimorfismo de Sequências Repetidas Simples) ou STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites* - Sítios de Microssatélites Marcados por Sequência) são sequências curtas (em torno de 300 pares de base) compostas de repetições em *tandem* de um a seis pares de nucleotídeos. A análise dos microssatélites é feita por amplificação do DNA genômico usando *primers* que flanqueiam os arranjos nucleotídeos repetidos, sendo os produtos geralmente

separados em géis de poliacrilamida, pois apresentam resolução suficiente para separar os fragmentos de DNA que, em geral, diferem por poucos nucleotídeos (até mesmo 1 ou 2). Para os mamíferos, as repetições mais comuns são as TG/AC. O polimorfismo é baseado no número de repetições das regiões amplificadas (GUIMARÃES, 2001).

Essa técnica com marcadores microsatélites vem substituindo outras técnicas que se utilizam de outros tipos de marcadores, principalmente devido a sua reprodutividade, simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo detectáveis (BORÉM e CAIXETA, 2006).

Além disso, há ainda mais vantagens relacionadas a essa técnica como a possibilidade de ampla cobertura do genoma e sua natureza co-dominante (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Portanto, é possível distinguir indivíduos homocigotos e heterocigotos, o que faz com que qualquer população animal possa ser utilizada como população de referência para estudos de ligação e mapeamento genético. Pela alta densidade que vêm apresentando alguns mapas genéticos de espécies domésticas, tem-se disponível um número muito grande de microsatélites para se estudar diversas regiões cromossômicas, o que permite aos pequenos laboratórios possam gerar informações genômicas (GUIMARÃES, 2001). Segundo o mesmo autor, outra vantagem desta técnica está na possibilidade de maior automação das análises por incorporação de sequenciadores automáticos equipados com programas para a análise de fragmentos. Estes equipamentos permitem inclusive que se façam análises multiplex, com amplificação e análise conjunta de vários sistemas de microsatélites com alto grau de confiabilidade nos resultados obtidos.

Os microsatélites têm sido muito utilizados para estudos de caracterização e diversidade genética, certificação racial, provas de paternidade, construção de mapas genéticos, estudo de genética de populações para identificação de raças, bem como para testes de associação para identificar regiões ligadas a um fenótipo de interesse (COLLINS et al., 1997; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; CAÑON et al., 2000).

O estudo de polimorfismos presentes no genoma de um indivíduo como medidor da diversidade biológica, foi um dos temas que, com maior interesse, desenvolveu-se nos últimos anos dentro do campo da genética animal. O interesse

na análise destes polimorfismos está amplamente justificado, já que o conhecimento da variabilidade genética das populações é indispensável no estabelecimento de planos de melhoramento na produção animal. O desenvolvimento recente das técnicas de biologia molecular incrementou as possibilidades de detecção de variabilidade genética no DNA de um indivíduo.

Entre as diferentes fontes de polimorfismos disponíveis no genoma, os *loci* de microssatélites podem ser considerados os principais marcadores utilizados nos últimos dez anos (OLIVEIRA et al., 2006).

Tais marcadores têm sido amplamente utilizados para estudos de caracterização da diversidade genética em espécies de animais de produção, dentre estas, bovinos (TAMBASCO et al., 2000; CARNEIRO et al., 2007), equinos (SERENO et al., 2008), caprinos (MENEZES et al., 2006), e ovinos (ARRANZ et al., 2001; SODHI et al., 2006; GIZAW et al., 2008).

Muitos estudos de caracterização genética em animais domésticos têm relatado de forma preocupante uma diminuição da variabilidade genética em grande parte das populações estudadas. Carneiro et al. (2007) observaram baixos índices de variabilidade genética em um rebanho brasileiro da raça bovina Nelore. De todos os *loci* de microssatélites analisados, 73% apresentaram deficiência de heterozigotos, sendo este índice superior ao encontrado em espécies sob o risco de extinção. Os autores atribuíram estes resultados a um excesso de endocruzamentos e cruzamentos preferenciais, como consequência do manejo reprodutivo utilizado. Machado et al. (2003) também relataram baixos índices de heterozigosidade em rebanhos brasileiros de quatro raças bovinas (Holandesa, Gir, Nelore e Guzerá). De acordo com o trabalho, os resultados obtidos sugerem que, dentro de cada raça, os animais avaliados apresentam uma elevada endogamia.

Sodhi et al. (2006) observaram um significativo déficit de heterozigotos em duas raças de ovinos indianos (Nali e Chokla), a partir do uso de 25 *loci* de microssatélites. Uma observação semelhante foi feita também por Aurora et al (2011) ao analisar 17 raças indianas de ovinos utilizando 25 *loci* de microssatélites. Segundo os autores, estes resultados também se devem ao aumento da endogamia nos rebanhos analisados. De forma semelhante, Handley et al (2007) encontraram baixos índices de variabilidade genética, a partir de um estudo com 29 raças de ovinos europeus. Entre as causas apontadas pelos autores está o pequeno número de machos utilizados nos acasalamentos, o que tem relação direta com o aumento

da consanguinidade. Em um trabalho com rebanhos de raças naturalizadas e exóticas de ovinos brasileiros, Paiva (2005) relatou valores significativos de consanguinidade e desequilíbrio das proporções de Hardy-Weinberg em rebanhos da raça Santa Inês. Em contrapartida, Peter et al. (2007) observaram altos índices de variabilidade genética em um extenso estudo com 1.748 animais de 57 raças de ovinos originárias da Europa e do Oriente Médio.

A partir dos resultados obtidos com a aplicação de *loci* de microssatélites para caracterização da diversidade genética, Paiva et al. (2008) demonstraram a possibilidade de se formar estratégias de acasalamento, com o objetivo de otimizar os níveis de endogamia dentro de um rebanho de conservação da raça ovina Crioula. Tais estratégias podem ser utilizadas com sucesso de modo a desenvolver um manejo genético das populações, tanto em rebanhos de conservação como em rebanhos comerciais, especialmente naqueles que não possuem um completo controle genealógico dos animais.

A identificação de animais com maior variabilidade genética é de grande importância no que se refere à identificação de genótipos superiores para a conservação (LOBO, 2013). Verifica-se, portanto, a necessidade de se medir a variabilidade genética dos animais, visto que a conservação dos recursos genéticos está efetivamente relacionada à manutenção das variabilidades inter-racial (evita a extinção das raças) e intra-racial (evita a erosão genética).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem e extração do DNA

O presente trabalho foi realizado com ovinos (*Ovis aries*) da raça Santa Inês de rebanhos do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Foram utilizados 20 animais por fazenda, totalizando 6 fazendas estudadas, sendo essas localizadas em Conselheiro Josino (CJ), Lagoa de Cima (LC), São Fidélis (SF), São João da Barra (SJB), Farol de São Tomé (SC) e Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Para a obtenção de DNA de cada animal, foram coletadas amostras de pelos da porção final da cauda, 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 (SOUZA et al. 2010).

Os pelos retirados 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 utilização (SOUZA et al. 2010).

Para cada extração de DNA foram utilizados 10 bulbos de pelos coletados de cada animal. Cada um dos pelos foi previamente observado ao microscópio óptico com aumento de 40X para a verificação da integridade e presença do bulbo, para

posteriormente ser cortado (separando-o do restante do pelo) e colocado em micro tubos de 1,5 mililitros onde ocorreu a reação de extração de DNA.

Para a reação de extração de DNA foram utilizadas duas soluções. A primeira, chamada de solução de lise, é uma solução de 200mM de NaOH. A segunda, chamada de solução neutralizante, consiste em de 200mM de HCL e 100mM de Tris HCL. Foram adicionados 50 microlitros da solução de lise em cada tubo eppendorf contendo 10 bulbos previamente visualizados e cortados. Depois, os bulbos foram agitados com a pipeta com o intuito de ocasionar o desprendimento das células que estavam presas ao pelo. Na etapa seguinte, os tubos foram submetidos ao aquecimento a 96° C por 15 minutos, para que as membranas celulares pudessem ser desnaturadas. Uma centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto foi a etapa seguinte. Essa etapa visa separar o DNA das organelas e proteínas presentes no interior das células que, após a lise celular, estarão dispersas na solução. Ao final desse processo, foram adicionados 50 microlitros da solução neutralizante com o objetivo de parar a atividade de lise, proporcionada pela primeira solução adicionada, e baixar o pH de toda a reação, tendendo para o pH neutro.

4.2 PCR e genotipagem dos *loci* de microssatélites

Para as PCR, foram selecionados 10 *loci* de microssatélites, sendo estes escolhidos com base na lista de recomendação da ISAG (International Society of Animal Genetics) para estudos de diversidade genética e paternidade em ovinos.

As PCR foram realizadas separadamente para cada *locus* em volumes de 20 µl por reação, contendo tampão para PCR [5X Green Go Taq 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 ultra pura e 5 microlitros de DNA pré-diluído 50x. Em cada reação foram utilizados controles negativos para monitorar possíveis contaminações. O programa de PCR utilizado foi constituído por um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação, sendo que em cada ciclo foi estabelecido 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. As

temperaturas de anelamento dos primers foram otimizadas para cada *locus* de microssatélite. A tabela 1 apresenta os dez *loci* propostos para o estudo nesse trabalho, com suas respectivas características:

Tabela 1 Informações sobre os *locus* estudados.

<i>Locus</i>	Temp. Anel. (°C)	Sequência do Primer 5' - 3'	Tamanho esperado de fragmento (pb)	Cromossomo em <i>Ovis aries</i>
OarFCB020	56	AAATGTGTTTAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC	92-112	2
OarAE129	61	AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG GTAGATCAAGATATAGAATATTTTTCA	133-159	5
OarFCB011	58	GGCCTGAAGTCAAGTTGATATATCTATCAC GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC	121-143	2
SRCRSP08	58	TGCGGTCTGTTCTGATTTTAC CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAG	212-242	Desconhecido
OarCP049	58	CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC GTGGGGATGAATATTCCTCATAAGG	85-107	17
SRCRSP05	56	TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG	141-149	18
MAF65	54	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCTCCTCCTGAGAATATAACATG	123-135	15
Inra63	58	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGAAG	165-199	14
OarFCB304	59	CCCTAGGAGCTTTCAATAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	150-188	19
MAF214	60	AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG	182-230	16

O sucesso da amplificação por PCR foi confirmado em gel de poliacrilamida (8%) com 20 centímetros de tamanho para uma corrida extensa com o objetivo de separar fragmentos de DNA que possam 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 dos tamanhos dos fragmentos obtidos. Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata.

Para a coloração, inicialmente 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 adequadamente, o gel, lavado com água destilada por 2 minutos que foi ser 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 se tornassem nítidos. Todas as etapas foram executadas com leve agitação com o intuito de promover uma coloração uniforme. Após a visualização em acrilamida, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar no equipamento AdvanCE FS96 (Advanced Analytical).

Como forma de ilustrar os procedimentos seguidos, na figura 1 pode-se observar as bandas geradas pela amplificação de alelos do locus SRCRSP05 (circuladas em vermelho) separadas pelo processo de eletroforese capilar. Nas figuras 2 e 3 estão ilustrados os gráficos para duas amostras específicas. Na figura 2, a amostra G12, mostrando dois alelos, um de 141 pares de base e outro de 148 pares de base, caracterizando-se como um heterozigoto. Na figura 3 a amostra H10, mostrando apenas um pico de 152 pares de base, caracterizando-o como um homozigoto.

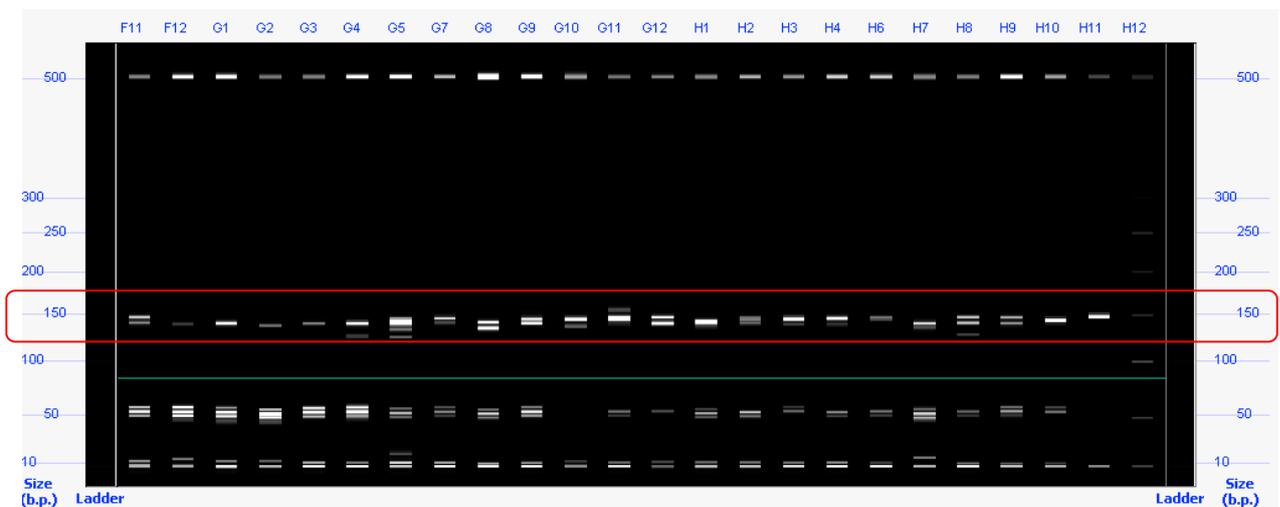


Figura 1 Bandas visualizadas após corrida eletroforética capilar do locus SRCRSP05

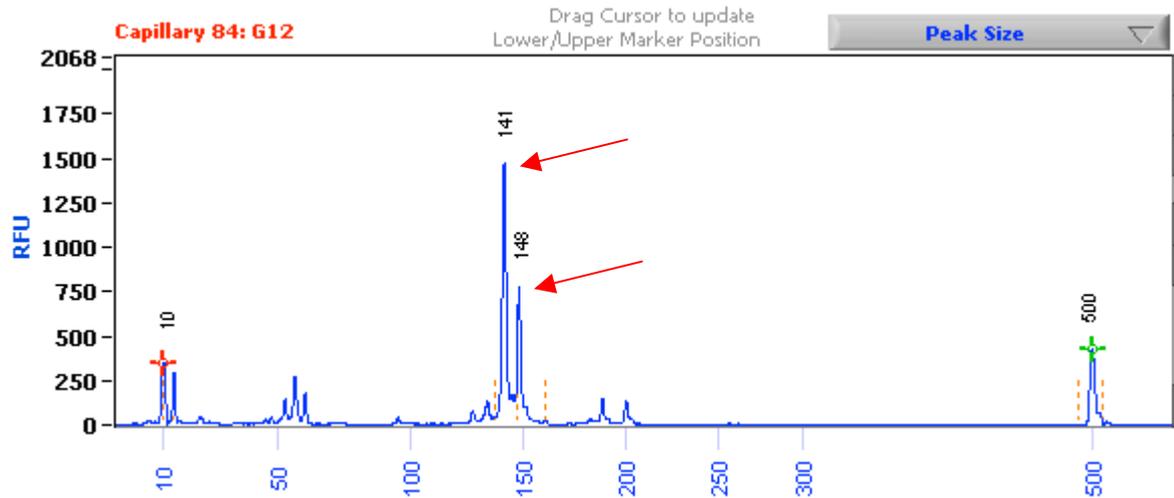


Figura 2 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um heterozigoto.

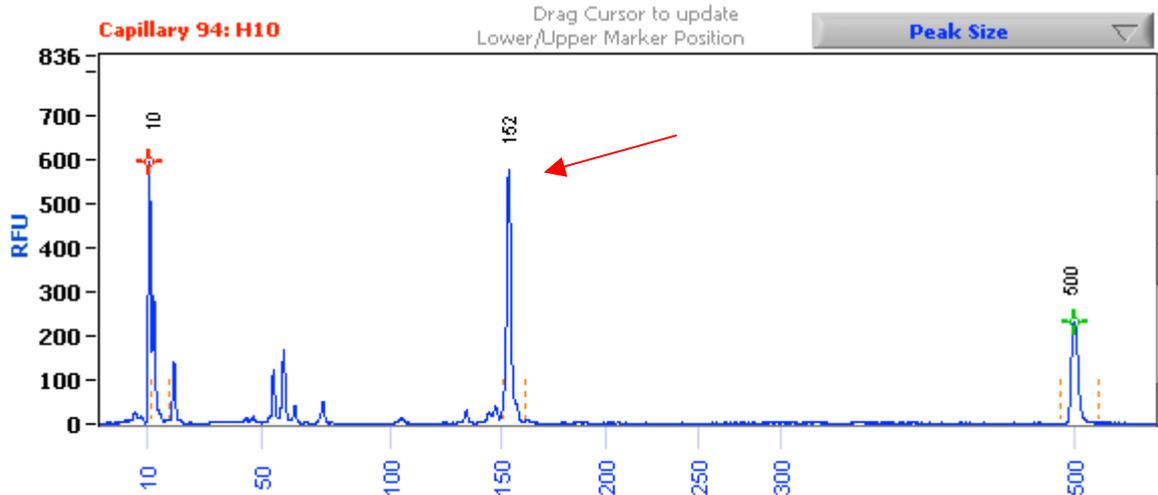


Figura 3 Curvas obtidas após corrida eletroforética capilar no equipamento AdvanCE FS96 mostrando um homozigoto.

4.3 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 a 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 (F_{is}) ou coeficiente de endogamia. O software PowerMarker v.3.25 foi usado para estas análises interpopulacionais. O programa de análise estatística Genes foi

usado para a construção de uma matriz de distâncias, que por sua vez foi processada no software R. Através dessa análise, o estudo de agrupamento com base na média das distâncias entre todos os pares de genótipo (UPGMA) foi feito, resultando em dendrogramas que mostram o agrupamento dos indivíduos dentro de uma mesma população, de acordo com os alelos apresentados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dez diferentes loci microssatélites, todos dinucleotídeos, foram analisados neste trabalho. Apenas o *locus* SRCRSP08 não obteve resultados positivos com amplificação de alelos ao final de todas os estudos.

Para todos os animais das seis fazendas utilizadas nesse trabalho, cada um dos dez *loci* foi estudado com o objetivo de se obter sua variabilidade alélica.

A tabela 2 mostra a quantidade de alelos encontrados em cada população para cada *locus* microssatélite.

Tabela 2 Número de alelos encontrados de cada *locus* em cada população de ovinos Santa Inês do norte do estado do Rio de Janeiro.

	CJ	LC	SC	SF	SJB	UENF
OarFCB20	9	9	9	5	6	9
OarAE129	2	0	0	0	3	2
OarFCB011	8	6	0	8	8	3
SRCRSP8	0	0	0	0	0	0
OarCP049	5	5	4	3	4	4
SRCRSP05	4	4	4	5	5	3
MAF65	0	1	0	0	4	0
Inra63	5	5	5	0	5	5
OarFCB304	5	6	6	6	0	3
MAF214	5	7	7	7	7	6

O *locus* mais polimórfico observado foi o OarFCB020, apresentando 9 alelos em 4 das 6 fazendas estudadas. O segundo *locus* mais polimórfico foi o OarFCB011, apresentando 8 alelos para 2 das 6 fazendas observadas. O *locus* menos polimórfico, no entanto, foi o OarAE129, apresentando apenas 3 alelos em uma das fazendas estudadas.

Bolormaa et al. (2008) observou em suas análises com populações de caprinos da Austrália um número de 7 alelos diferentes para o *locus* OarFCB20. Em um estudo executado em ovinos Barbados Blackbelly no Caribe, Roberts et al. (2003) encontrou, por sua vez, dez alelos diferentes para o mesmo *locus* (OarFCB20), concluindo ao final que as populações analisadas apresentaram alta variabilidade genética. Roberts et al. (2003), analisou um total de 11 *locis* em ovinos da raça Barbados Blackbelly, sendo desses, além do OarFCB20, também utilizados em comum com este trabalho mais três *locus* microssatélites: MAF65, SRCRSP05 e MAF214. Oito alelos foram encontrados no total para os *loci* MAF65 e SRCRSP05 e apenas três alelos foram encontrados para o *locus* MAF214 no trabalho acima citado.

Na tabela 3, são apresentados os números de alelos encontrados por Roberts et al. (2003) em comparação ao número de alelos para os mesmos *loci* encontrados neste trabalho.

Tabela 3 Comparação entre números de alelos encontrados de 4 *loci* por Roberts et al (2003) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro.

<i>Locus</i>	Roberts et al. (2003)	Estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro
OarFCB020	10	9
MAF65	8	4
SRCRSP05	8	5
MAF214	3	7

A comparação entre os resultados das análises evidenciada na tabela 3 mostra um número menor de alelos encontrados neste trabalho, exceto o microssatélite MAF214. Tal comparação sugere que a variabilidade genética encontrada nos rebanhos analisados neste trabalho encontra-se baixa, havendo provavelmente a perda de alelos.

Pandey et al. (2008) encontraram apenas dois alelos para o *locus* OarAE129 em rebanhos de ovinhos da raça Shahabadi na Índia. Estes mesmos autores relatam que foi o *locus* com menor quantidade de alelos encontrado. Em paralelo, foram encontrados apenas três alelos para esse *locus* neste trabalho.

Kevorkian et al. (2010) encontraram para o *locus* OarFCB11 doze alelos na maior das populações analisadas em seu trabalho com ovelhas da Romênia. Além desse, os *loci* OarFCB20, MAF214 e MAF65 também foram usados por esse autor para esse trabalho. Na tabela 4, a comparação entre o número de alelos encontrados neste trabalho e no supracitado, mostrando maior variabilidade genética no trabalho de Kevorkian et al. (2010), com a exceção novamente do *locus* MAF214, desta vez se equiparando com 7 alelos. A tabela 4 evidencia a menor variabilidade genética encontrada nos rebanhos de ovinos Santa Inês utilizados nesse estudo.

Tabela 4 Comparação entre números de alelos encontrados de 4 *loci* por Kevorkian et al (2003) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro.

<i>Locus</i>	Kevorkian et al. (2010)	Estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro
OarFCB011	12	8
OarFCB020	13	9
MAF214	7	7
MAF65	10	4

Visser et al. (2010) encontraram oito alelos para o *locus* SRCRSP08 em seu trabalho com Cabras da África do Sul. Mais recentemente, Qwabe et al. (2013) encontraram sete alelos para este *locus* em ovinos da raça Namaqua Afrikaner, também na África do Sul. O encontrado nesse trabalho mostra bandas obtidas pela eletroforese capilar de tamanho reduzido, não estando entre a margem de tamanho de fragmento esperado para esse *locus* (212-242pb), não podendo desta forma serem enquadradas como alelos de interesse e, por conseguinte, sendo considerados apenas como ampliações inespecíficas. Pode-se levantar hipóteses relacionadas ao sítio de anelamento do primer nos ovinos Santa Inês analisados, ou mesmo relacionar as bandas de baixo tamanho a regiões que sofreram mutações nessa raça, estando essas fora do tamanho comumente observado para este *locus*.

Qwabe et al. (2013) analisaram em seu trabalho outros *loci* em comum com este trabalho. Na tabela 5 estão as comparações das quantidades de alelos encontrados nos dois trabalhos supracitados.

Qwabe et al. (2013) encontrou em seu trabalho sete alelos do *locus* SRCRSP08, já o estudo com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro, não apresentou nenhum alelo amplificado. O número de alelos dos demais loci analisados por Qwabe et al. (2013) tem como média 5, enquanto os encontrados neste trabalho, 5.75, sugerindo que o nível de variabilidade genética dos rebanhos analisados em ambos os trabalhos é baixo.

Tabela 5 Comparação entre números de alelos encontrados de 5 *loci* por Qwabe et al. (2013) e no estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro..

<i>Locus</i>	Qwabe et al. (2013)	Estudo feito com os ovinos do norte do estado do Rio de Janeiro
SRCRSP08	7	0
OarCP49	6	5
SRCRSP05	2	5
INRA63	7	5
OarFCB011	5	8

Ibrahim et al. (2010) encontraram oito alelos diferentes para o *locus* OarFCB304 em seu trabalho onde usou raças de ovinos do Paquistão. Em comparação à quantidade de alelos encontrada neste trabalho para o *locus* OarFCB304 (6), nota-se a maior variabilidade genética dos ovinos do Paquistão. Em geral, a quantidade de alelos encontrada para cada *locus* analisado (neste trabalho) foi inferior aos encontrados em pesquisas similares, demonstrando assim a baixa variabilidade genética dos rebanhos estudados de ovinos Santa Inês.

Nos dendrogramas apresentados, as alturas dos cortes foram definidas objetivando-se a separação de grupos de similaridade genética da melhor forma possível, separando animais em grupos distintos apenas se estes apresentam um elevado nível de diferenças alélicas. A figura 4 apresenta o dendrograma da fazenda CJ, onde um corte feito aproximadamente em 0.675 foi suficiente para separar os genótipos encontrados em cinco grupos distintos.. Em verde, o único indivíduo “6”, apresentou uma configuração alélica única, assim como o indivíduo em cinza “20”, distanciando-os dos maiores grupos da população. Destacados em azul, os indivíduos “4”, “13” e “9”, “12” foram agrupados juntos por apresentarem a ocorrência

dos mesmos 4 alelos, aproximando-os geneticamente. Em vermelho, o maior grupo de indivíduos com repetição de alelos, obteve-se a ocorrência de sete alelos repetidos. Em amarelo, o segundo maior agrupamento de indivíduos com menor variabilidade genética entre si, foi observada a ocorrência dos mesmos sete alelos para os mesmos *loci*. Com a exceção dos animais “6” e “20”, 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.

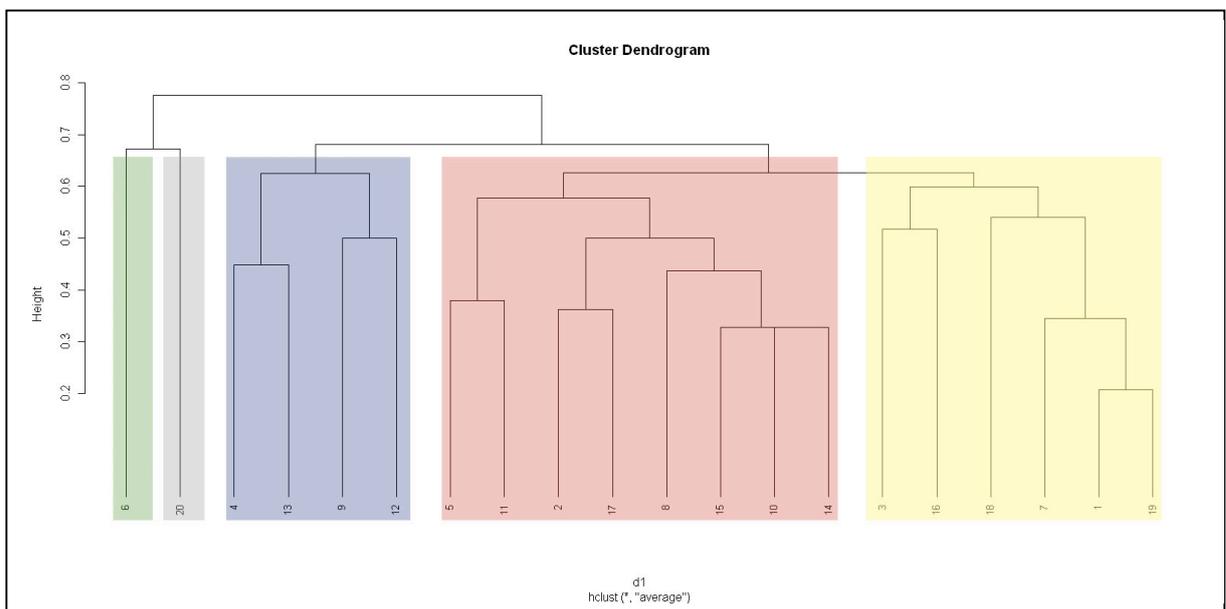


Figura 4 Dendrograma da fazenda CJ, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 5 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada.

Na figura 5, observa-se o dendrograma da fazenda LC, onde um corte aproximadamente em 0,65 foi o suficiente para separar os genótipos em apenas dois grupos distintos. Os indivíduos destacados em verde apresentaram repetição em quatro alelos, o que os aproxima geneticamente. O *locus* menos polimórfico nesse grupo foi o OarFCB020 e o mais polimórfico é o OarCP04, apresentando 3 alelos. Os indivíduos destacados em vermelho, por sua vez, apresentaram repetição de sete alelos entre a maior parte dos indivíduos, sendo o *locus* menos polimórfico o OarCP049 e o mais polimórfico o MAF65, com 4 alelos diferentes. Os indivíduos “6” e “20” apresentam alto grau de similaridade genética, de acordo com o dendrograma, compartilhando os mesmos alelos em praticamente todos os *loci*

analisados. Em comparação com o dendrograma da fazenda CJ, LC apresenta uma nítida menor variabilidade, verificando-se apenas dois grupos de similaridade genética.

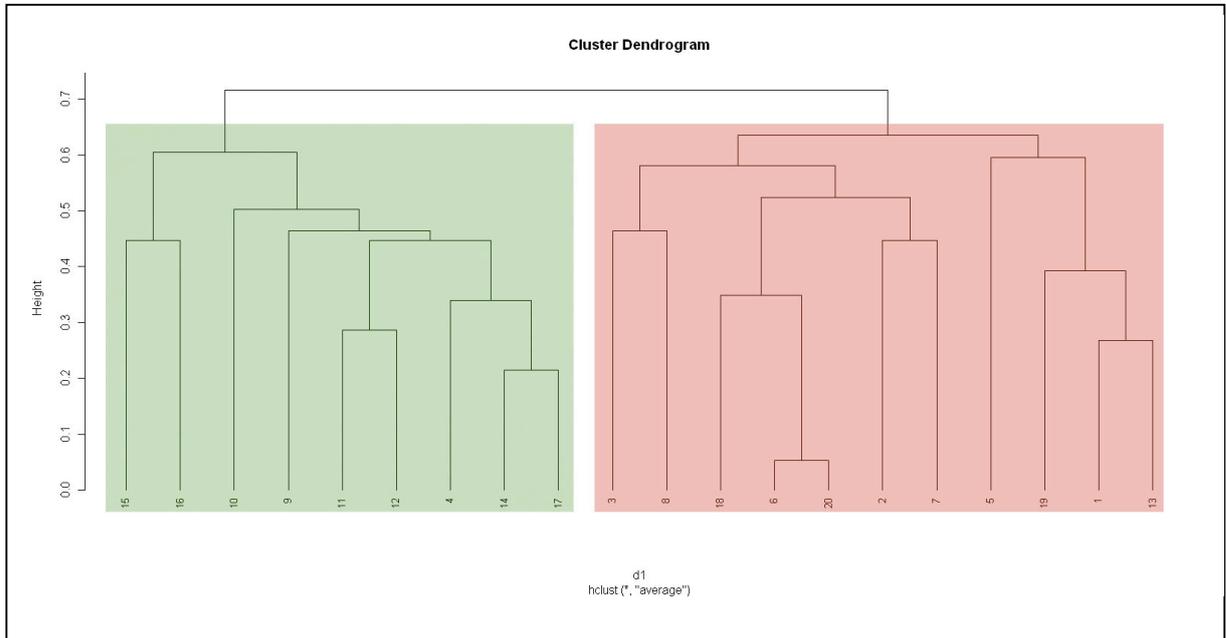


Figura 5 Dendrograma da fazenda LC, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 2 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada.

Na figura 6, observa-se o dendrograma da fazenda SC, onde um corte aproximadamente em 0,685 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos.

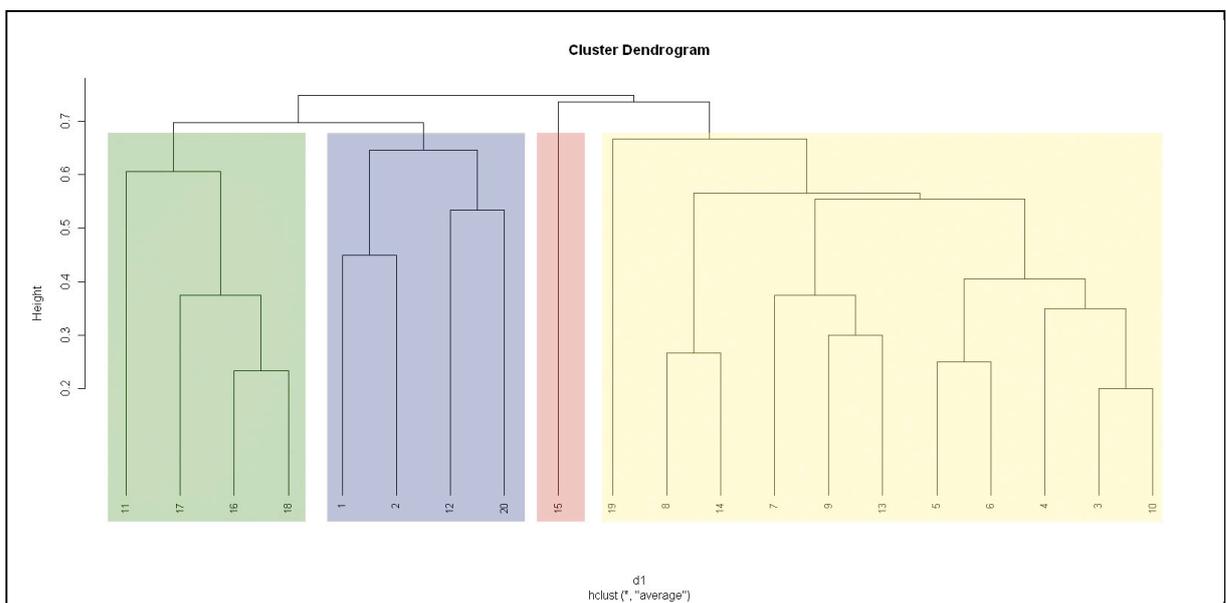


Figura 6 Dendrograma da fazenda SC, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada.

O indivíduo “15”, destacado em vermelho, apresenta a menor similaridade com os outros grupos de indivíduos da população analisada. Em verde, os indivíduos destacados compartilharam 6 alelos diferentes dos *loci* estudados. O *locus* menos polimórfico foi OarFCB304. Os *loci* que apresentam maior polimorfismo foram MAF214 e Inra63, ambos com 3 alelos.

Destacados em azul, outro grupo de indivíduos de igual tamanho ao anterior (4 animais) que apresentaram maior similaridade genética. Compartilhando 5 alelos entre todos os *loci* analisados, o *locus* microssatélite de menor polimorfismo foi MAF214. Com 5 alelos diferentes dentro do grupo destacado em azul, o *locus* de maior polimorfismo foi OarFCB304.

Destacados em amarelo, os indivíduos que formam o maior grupo de similaridade genética nessa fazenda. Com 11 animais, o grupo compartilha 4 alelos entre os *loci* analisados. Com menor polimorfismo observado, o *locus* OarFCB304 (apenas 1 alelo em todos os 11 indivíduos) e com maior polimorfismo, os *loci* OarCp049 e MAF214 com 5 alelos cada, portanto, pode-se concluir que a fazenda SC apresenta maior variabilidade genética entre seus animais que a fazenda LC.

Na figura 7, é apresentado o dendrograma da fazenda SF onde um corte aproximadamente em 0,685 foi o suficiente para separar os genótipos em apenas dois grupos distintos.

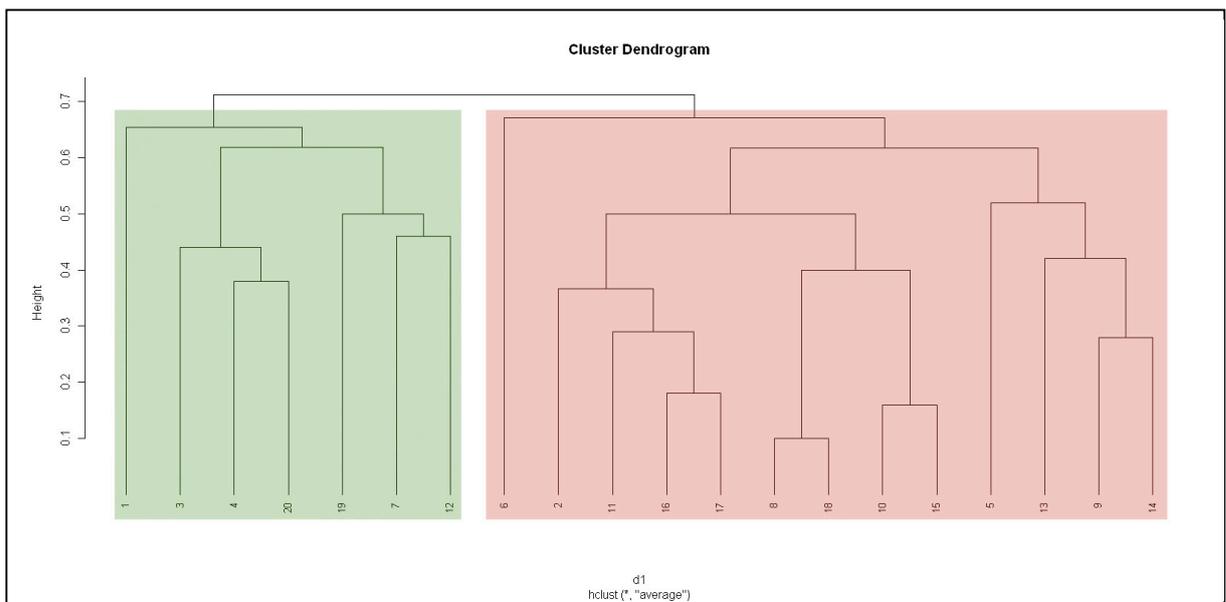


Figura 7 Dendrograma da fazenda SF, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 2 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada.

O primeiro grupo, destacado em verde, conta com sete indivíduos que apresentam maior similaridade nos alelos encontrados dos *loci* analisados. Compartilhando, na maior parte dos indivíduos, três alelos, o *locus* menos polimórfico foi OarCP049, com apenas um alelo, e o mais polimórfico foi MAF214 com cinco alelos distribuídos nos sete animais. O grupo destacado em vermelho apresenta treze indivíduos com diferentes graus de similaridade genética entre si. Os indivíduos mais similares em termos de ocorrência de alelos são “8” e “18”, não compartilhando apenas um alelo entre todos os observados. O grupo destacado em vermelho compartilha na maioria dos animais estudados 5 alelos, sendo o *locus* menos polimórfico MAF214, com dois alelos, e o mais polimórfico OarFCB011, com 5 alelos. Desta forma, pode-se concluir que a fazenda SF apresenta baixo grau de variabilidade genética, se comparada com a fazenda SC.

Na figura 8, no dendrograma da fazenda SJB, identifica-se que um corte aproximadamente em 0,65 foi o suficiente para separar os genótipos em apenas dois grupos distintos. O primeiro grupo, destacado em verde, conta com oito indivíduos que apresentam maior similaridade nos alelos encontrados dos *loci* analisados. Compartilhando, na maior parte dos indivíduos, quatro alelos, o *locus* menos polimórfico foi MAF214, com dois alelos, e o mais polimórfico foi SRCRSP05 com cinco alelos distribuídos nos oito animais. O grupo destacado em azul apresenta doze indivíduos com diferentes graus de similaridade genética entre si. Os indivíduos mais similares em termos de ocorrência de alelos são “7” e “18”, não compartilhando apenas um alelo entre todos os observados. O grupo destacado em azul compartilha na maioria dos animais estudados 3 alelos, sendo o *locus* menos polimórfico Inra63, com dois alelos, e o mais polimórfico OarFCB011, com 5 alelos.

Os animais da fazenda SJB são provenientes de outra fazenda da região, onde pode-se inferir que houve muitos acasalamentos entre animais de parentesco próximo, culminando em baixa variabilidade genética dos animais.

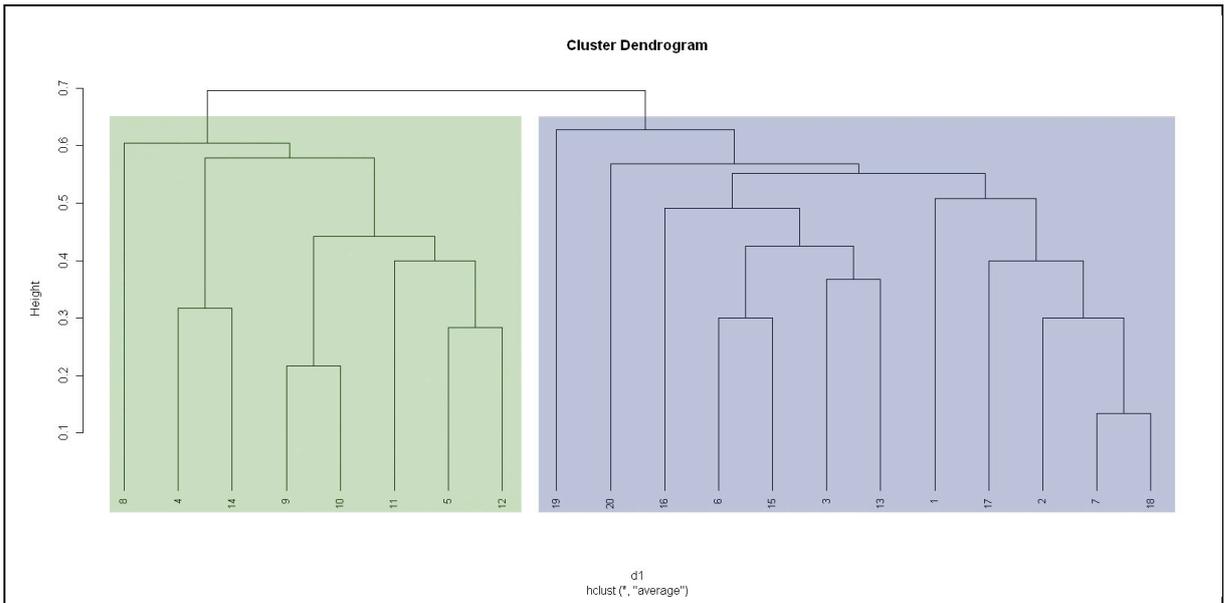


Figura 8 Dendrograma da fazenda SJB, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 2 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada.

Na figura 9, apresenta-se o dendrograma dos animais da UENF onde um corte aproximadamente em 0,61 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos.

No primeiro grupo, destacado em verde, apenas 3 indivíduos demonstraram maior similaridade genética, baseando-se nos *loci* analisados. Compartilhando dois alelos entre os animais, o *locus* menos polimórfico foi OarFCB304. Os *loci* OarFCB020, OarCP049, SRCRSP05 e MAF214 apresentaram dois alelos cada um, nos animais pertencentes a este subgrupo. O indivíduo “11”, destacado em azul, apresenta a menor similaridade com os outros grupos de indivíduos da população analisada. Em vermelho, cinco indivíduos compartilham em sua maior parte cinco alelos entre os *loci* analisados. O *locus* menos polimórfico foi OarFCB020 e os mais polimórficos foram Inra63 e OarFCB304, com 3 alelos diferentes cada.

Em amarelo, o subgrupo mais numeroso onde onze indivíduos apresentaram com maior frequência dois alelos que os agrupam por similaridade de *loci*. O *locus* analisado menos polimórfico foi OarCP049 com apenas um alelo apresentado em todos os indivíduos e, o mais polimórfico foi OarFCB020, com cinco alelos diferentes.

Os animais da UENF são provenientes de outra fazenda onde existia o cuidado com os acasalamentos entre animais de parentesco próximo. Dessa forma,

pode se inferir que a variabilidade genética entre os animais dessa fazenda é maior do que os valores encontrados nas fazendas SJB, SF e LC.

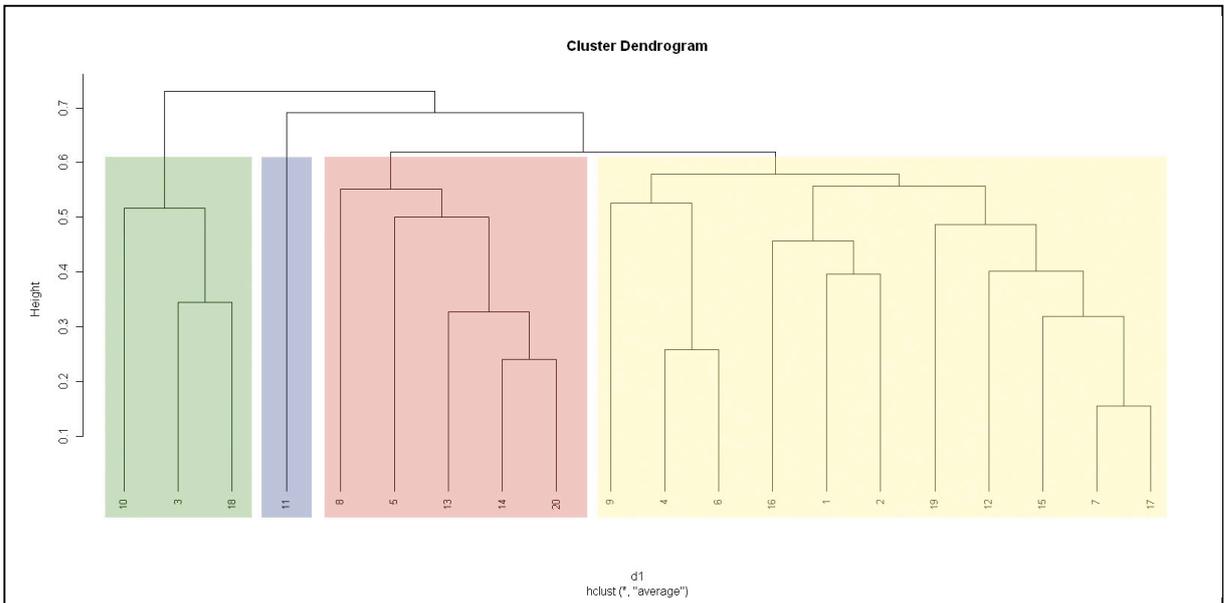


Figura 9 Dendrograma da fazenda UENF, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada.

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 mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Na tabela 6, a lista com a Heterosidossidade observada, Heterosigosidade esperada, a Diversidade Alélica e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) de cada locus estudado.

Tabela 6 Diversidade alélica, Heterozigosidade observada, Heterozigosidade esperada, Conteúdo de Informação polimórfica (PIC) dos locus estudados.

Locus	Diversidade Alélica	Ho	He	Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC)	Coefficiente de Endogamia
OarFCB020	9	0,1642	0,8551	0,8381	0,8106
OarAE129	3	0,0000	0,4490	0,4065	1,0000
OarFCB011	8	0,2500	0,8130	0,7881	0,6984
SRCRSP08	0	-	-	-	-
OarCP049	5	0,2124	0,6358	0,5892	0,6684
SRCRSP05	5	0,2212	0,6639	0,5994	0,6692
MAF65	4	0,0556	0,4367	0,3930	0,8794
Inra63	5	0,5974	0,6614	0,5994	0,1032
OarFCB304	6	0,2947	0,7564	0,7183	0,6137
MAF214	7	0,2273	0,5884	0,5439	0,6173

Nove *loci* microssatélites analisados neste trabalho apresentaram polimorfismo, com a exceção do *locus* SRCRSP08, que não apresentou amplificação no PCR, ou seja, nenhum alelo foi observado. A heterozigosidade observada para o locus OarAE129 teve zero como resultado, pelo fato de todos os 3 alelos obtidos terem aparecido como homozigotos.

O *locus* OarFCB020 apresentou um valor de PIC elevado, sendo assim então considerado altamente informativo. Com a diversidade alélica sendo a maior encontrada (9 alelos), teve uma heterozigosidade observada de 0,1642, menor que a encontrada no trabalho de Al-Barzinji et al. (2011), ou seja, um valor de 0,400. A heterozigosidade esperada para este locus foi 0,8551.

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* OarFCB011, o valor encontrado para a heterozigosidade observada (0,25) está muito abaixo da esperada (0,8130). Esses dados, comparados com o nível de endogamia (0,6984), indicam a perda de heterozigosidade da população e um nível de endogamia relativamente alto, mesmo este sendo o segundo locus analisado com maior número de alelos observados. Musthafa et al. (2012) encontrou para o mesmo locus 10 alelos diferentes em seu trabalho, valores de Ho de 0,81 e He de 0,86. De acordo com esses dados, Musthafa et al. (2012) obteve para esse locus específico dados que comprovam alta heterozigosidade.

Os locus OarCP049 e o SRCRSP05 apresentaram 5 alelos diferentes, e taxas de H_o mais baixas que as de H_e (0,2124 e 0,2212 respectivamente para H_o , 0,6358 e 0,6639 respectivamente para H_e), indicando baixa heteroziguidade. Souza et al. (2012) encontrou em populações de ovinos Santa Inês de vários estados do Brasil valores de H_o 0,877 e H_e 0,866 para o locus OarCP049 e H_o 0,609 e H_e 0,675 para o locus SRCRSP05, concluindo que nos rebanhos analisados uma alta taxa de heteroziguidade foi encontrada. Este autor também encontrou como resultado para o locus Inra63 12 alelos diferentes (em comparação com os 5 alelos encontrados nas populações estudadas nesse trabalho) e H_o 0,815 e H_e 0,830, valores que demonstram alta heteroziguidade da população para esse específico locus em diversos rebanhos do Brasil. Neste trabalho, os dados para H_o e H_e para o locus Inra63 foram respectivamente 0,5994 e 0,6614 e o coeficiente de endogamia de 0,1032 demonstram que este locus conservou alta heteroziguidade. Os loci OarFCB304 e MAF214 também foram utilizados no trabalho de Souza et al. (2012). Para esses loci foram encontrados H_o 0,740 e 0,531 respectivamente e, H_e 0,786 e 0,469 respectivamente, indicando para ambos um alto nível de heterozigose. Nos rebanhos analisados no norte do estado do Rio de Janeiro, 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, revelando assim baixo nível de heteroziguidade.

O locus MAF65 apresentou H_o 0,0556 e H_e 0,4367 e a presença de 4 alelos diferentes. Com o coeficiente de endogamia de 0,8794, este locus mostra também baixa heteroziguidade e alta 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 heteroziguidade foi encontrada.

6. CONCLUSÃO

Nove dos dez marcadores microssatélites utilizados foram adequados para verificar os níveis de heterosigosidade e endogamia para as populações estudadas.

Os loci foram polimórficos e apresentaram baixa diversidade alélica nas fazendas estudadas do norte do estado do Rio de Janeiro.

Foi encontrado altos valores de coeficiente de endogamia, demonstrando alta proximidade de parentesco entre os animais das fazendas estudadas.

10. REFERÊNCIAS

- Al-barzinji Y.M.S., Lababidi S., Rischkowsky B., Al-Rawi A. A., Tibbo M., Hassen H., Baum M. (2011) Assessing genetic diversity of Hamdani sheep breed in Kurdistan region of Iraq using microsatellite markers. *In: African Journal of Biotechnology. Vol 10, pg 15109-15116.*
- Araujo A.M., Guimaraes 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.*
- Arranz J-J., Bayon Y., San Primitivo F. (2001) Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genetics Selection Evolution 33: 529-542.*
- Aurora R., Bhatia S., Mishra B.P., Joshi B.K. (2011) Population structure in Indian sheep ascertained using microsatellite information. *Animal Genetics*. Doi: 10.1111
- Barker J.S.F. (1994) A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. *World Congress Of Genetics Applied to Livestock Production 5: 501-508.*
- Benitez D., Cardellino R.A., Sousa W.H. (2008) Contribuição do melhoramento genético à produção e qualidade de carne ovina no Brasil. *In: VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, São Carlos - SP.*

- Bolormaa S., Ruvinsky A., Walkden-Brown S., van der Werf J. (2008) Genetic relationships among Australian and Mongolian fleece-bearing goats. In: *Australian Journal of Animal Sciences*, Vol.21.
- Borém A., Caixeta E.T. (2006) Marcadores Moleculares. 1ª Ed. *Universidade Federal de Viçosa*. 374p.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolmick, 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. (2004) Endogamia e limite de seleção em populações selecionadas obtidas por simulação. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33: 2017-2025.
- Calvo J.H., Bouzada J.A., Jurado J.J., Serrano M. (2005) Genetic substructure of the Spanish Manchega sheep breed. *Small Ruminant Research* 64(1-2): 116-125.
- Cañon J., Checa M.L., Carleos C., Veja-Pla J.L., Vallejo M., Dunner S. (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite. *Animal Genetics* 31: 253-264.
- 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.
- Collins F.S., Guyer M.S., Chakravarti A. (1997) Variations on a theme cataloguing human DNA sequence variation. *Science* 278: 1580-1581.
- Costa D.S., Costa M.D., Silva F.V., Rocha Júnior V.R., Carvalho Z.G., Tolentino D.C., Leite J.R.A. (2012) Desempenho Ponderal de Cordeiros Santa Inês em pastagens naturais. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador*, v.13, n.1, p.237-243.

- Danell B. (1994) Methods of conservation of farm animals. *Genetics Sources In Farm Animals and Plants. Report from Research Symposium, Ed. The Nordic Council of Ministers, 27-29.*
- Eding H. (2001) Conservation of genetic diversity: assessing genetic variation using marker estimated kinships. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Wageningen, *Wageningen University, 79p.*
- Falconer D.S., Mackay T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics. Harlow: *Longman House.*
- FAO (1995) Segundo documento de líneas directrices para la elaboración de planes nacionales de gestión de los recursos genéticos de animales de granja. Medida de la diversidad de los animales domésticos (MoDAD): Marcadores microsatélites recomendados. MoDAD-FAO. Disponível em <http://dad.fao.org>
- FAO (2001). In: DAD-IS 2. Domestic Animal Diversity Information System. Roma, Itália: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <http://dad.fao.org>
- Ferreira M.E., Gattapaglia D. (1996) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. *Embrapa/Cenargen, Brasília-DF, 219 p.*
- Ferreira M.E., Gattapaglia D. (1998) Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético. 1ª ed. *Embrapa/Cenargen, Brasília-DF, 220 p.*
- Genes Programa: http://www.ufv.br/dbg/genes/Genes_Br.htm
- Gizaw S., Komen H., Windig J.J., Hanotte O., Van Arendonk J.A.M. (2008) Conservation priorities for Ethiopian sheep breeds combining threat status, breed merits and contributions to genetic diversity. *Genetics Selection Evolution* 40: 433-447.

- GUIMARÃES S.E.F. (2001) *Análise de marcadores genômicos e detecção de QTL's e genes candidatos em melhoramento animal*. In: Pereira J.C.C. Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal. 3.ed. Belo Horizonte - MG , FEPMUZ Editora, p. 491-524.
- Hall S.J.G., Bradley D.G. (1995) Conserving livestock breed biodiversity. *Tree* 10: 267-270.
- Handley L-J. L., Byrne K., Santucci F., Townsend S., Taylor M., Bruford M.W., Hewitt G.M. (2007) Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity* 99: 620-631.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010.
- Kevorkian S.E.M., Georgescu S.E., Manea M.A., Zaulet M., Hermenean A.O., Costache M. (2010) Genetic diversity using microsatellite markers in four Romanian autochthonous sheep breeds. In: *Romanian Biotechnological Letters*, vol 15. Nº1.
- Leguiza C.D.P. (2007) Marcadores microssatélites 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.
- Lobo F.P., Yamagishi M.E.B., Caetano A.R., McManus C.M., Carneiro P.L., Faco O., Souza C.J.H., Paiva S.R. (2013) Genetic Origin Of Brazilian Local Adapted Sheep (*Ovis Áries*) Breeds By Complete Mitochondrial Genome Data Analysis. *Plant & Animal Genome XXI, San Diego, CA*.
- Lôbo R.N., Sousa W.H. (2006) 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.
- Lôbo R.N.B., Lôbo A.M.B.O. (2007) Melhoramento genético como ferramenta para o crescimento e o desenvolvimento da ovinocultura de corte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31(2): 247-253.

- Lopes D.D. (2012) Variabilidade genética, estrutura populacional e relações evolutivas de cabras crespas com base em marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.*
- Machado M.A., Schuster I., Martinez M.L., Campos A.L. (2003) Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32: 93-98.
- MacManus C., Paiva S.R., Araújo R.O. (2010) Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p-236-246.
- 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.
- Mateus J.C., Eding H., Penedo M.C. et al. (2004) Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Animal Genetics* 35: 305-313.
- Menezes M.P.C., Martinez A.M., Ribeiro M.N., Filho E.C.P., Bermejo J.V.D. (2006) Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(4) 1336-1341.
- Mexia A.A., Oliveira M.A., Ferreira J.V.N., Batista M.A., Araújo F.E. (2012) Lucratividade de Ovinos Mestiços Santa Inês X Pantaneiro em Pastejos Suplementados com Concentrado. *Synergismus Scyentifica UTFPR, Pato Branco.*

- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Intercâmbio comercial de agronegócio: Principais mercados de destino. Brasília: 2009. P469
- Morais O.R. (2001) *O melhoramento genético de ovinos no Brasil*. In: Pereira J.C.C. (ed) *Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal*. 3.ed. Belo Horizonte - MG , FEPMUZ Editora, p. 358-371.
- Morais O.R., Albuquerque F.H. (2006) *Novas tendências e perspectivas da raça Santa Inês no Brasil*. In: Encontro Nacional de Produção de Caprinos e Ovinos, 1., Campina Grande. *Anais...*Campina Grande: SEDAP/SEBRAE, p.429.
- Mueller J. (1996) Objetivos de mejoramiento para ruminantes menores. In: XXIX Reunión Anual Sociedad de Génitca de Chile. Comunicación técnica INTA. Bariloche PA PA Nº 294, 6 p. *Noticiero de Biología* 4:61.
- Musthafa M.M., Aljumrah R.S., Alshaik M.A. (2012) Genetic diversity of Najdi sheep based on microsatellite analysis. In: *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, pg 14868-14876.
- Notter D.R. (1999) The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Animal Science* 77: 61-69.
- Oliveira E.J., Pádua J.G, Zucchi M.I., Vencovsky R., Vieira M.L.C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Biology Molecular* 29(2): 294-307.
- Paiva S.R. (2005) *Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 108p.
- Paiva S.R., Barretto G.B., Souza C.J.H. (2008) Uso de marcadores moleculares como ferramenta no manejo reprodutivo de um rebanho de conservação. *VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, São Carlos - SP*.

Pandey A.K., Sharma R., Singh Y., Mishra B.P., Mondal K.G., Singh P.K., Singh G., Joshi B.K. (2010) Variation of 18 STR *Loci* in Shahabadi sheep of India. In: *Russian Journal of Genetics*, Vol. 46, N° 1, PP. 86-92.

Pereira J.C.C (2012) Melhoramento genético aplicado à produção animal. *FEPMVZ-Editora*, 6° edição, Belo Horizonte.

Peter C., Bruford M., Perez T., Dalamitra S., Hewitt G., Erhardt G. and the ECONOGENE Consortium (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* 38: 37-44.

Powermarker: <http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>

Qwabe S.O., Van Marle Köster E., Visser C. (2013) Genetic diversity and population of the endangered Namaqua Afrikaner sheep. In: *Tropical Animal Health and Production*. 45, pg 511-516.

R Project: <http://www.r-project.org>

Regitano L.C.A., Veneroni G.B. (2009) *Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal*. In: Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal. São Carlos - SP.

Roberts C. S., Thomas G. (2003) Use of microsatellite markers to include or exclude individuals as Barbados Blackbelly sheep. *A paper presented at the National Agricultural Research Conference, Cave Hill Barbados, 5-6 May 2003. Conference hosted by Min of Agriculture & Rural Development, Barbados*

Sereno F.T.P.S., Sereno J.R.B., Veja-Pla J.L., Kelly L., Bermejo J.V.D. (2008) Genetic diversity of Brazilian Pantaneiro horse and relationships among horse breeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(5): 595-604.

Sodhi M., Mukesh M., Bhatia S. (2006) Characterizing Nali and Chokla sheep differentiation with microsatellite markers. *Small Ruminant Research* 65: 185-192.

- 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.*
- Sousa W.H., Cezar M.F., Cunha M.G., Lôbo R.N. (2006) *Estratégias de cruzamento para produção de caprinos e ovinos de corte: uma experiência da EMEPA.* In: Encontro Nacional de Produção de Caprinos e Ovinos, 1., Campina Grande. *Anais...Campina Grande: SEDAP/SEBRAE/INSA/ARCO, p.338.*
- Souza E.S., Falcão D.R.A., Leal S.R., Corrêa T.S., Quirino C.R. (2010) Métodos para coleta e armazenamento de pêlos em ovinos (*Ovis aries*), visando a obtenção de DNA. In: 10ª Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro.
- 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.*
- Tambasco D.D., Alencar M.M., Coutinho L.L., Tambasco A.J., Tambasco M.D., Regitano L.C.A (2000) Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. *Revista Brasileira Zootecnia 29(4): 1044-1049.*
- Visser C., Crooijmans R.P.M.A., Van Marle Köster E. (2010) A genetic linkage map for the South American Angora goat. In: *Small Ruminant Research 93. Pg 171-179.*