



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL /
BIOPROSPECÇÃO**

JOYCE AZAMBUJA DE OLIVEIRA

**FILOGENIA DE OVINOS SUL-MATOGROSSENSES E ESTUDO
COMPARATIVO COM A RAÇA CRIOLA DO SUL DO BRASIL**

**DOURADOS - MS
Maio/2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

**FILOGENIA DE OVINOS SUL-MATOGROSSENSSES E ESTUDO
COMPARATIVO COM A RAÇA CRIOULA DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, por Joyce Azambuja de Oliveira, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral/Bioprospecção, sob orientação da Prof^ª Dr^ª Alexéia Barufatti Grisolia e coorientação da Dr^ª Andréa Alves do Egito.

**DOURADOS - MS
Maio/2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O482f	<p>Oliveira, Joyce Azambuja de. Filogenia de ovinos sul-matogrossenses e estudo comparativo com a raça crioula do sul do Brasil. / Joyce Azambuja de Oliveira. – Dourados, MS : UFGD, 2014. 85f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Alexéia Barufatti Grisolia. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. <i>Ovis aries</i>. 2. Herança materna. 3. Raça Pantaneira. 4. Sequenciamento. I. Título.</p> <p>CDD – 636.31</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

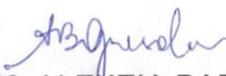
©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

"FILOGENIA DE OVINOS SUL-MATOGROSSENSSES E ESTUDO COMPARATIVO
COM A RAÇA CRIOLA DO SUL DO BRASIL".

POR

JOYCE AZAMBUJA DE OLIVEIRA

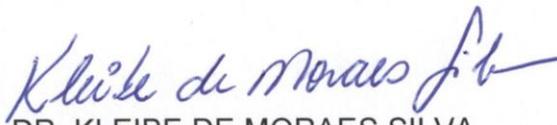
DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE
DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF^a. DR^a. ALEXEIA BARUFATTI GRISOLIA
ORIENTADORA - UFGD



PROF. DR. FERNANDO MIRANDA DE VARGAS JUNIOR
MEMBRO TITULAR – UFGD



DR. KLEIBE DE MORAES SILVA
MEMBRO TITULAR – EMBRAPA / CAPRINOS E OVINOS

APROVADA EM 26 DE MAIO DE 2014.

*Aos meus pais, Clóvis e Marionis, e ao meu irmão,
Vinícius, pelo apoio e pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Deus: pela saúde, pelas oportunidades, por ter me escutado e não ter me deixado desistir quando parecia que ia dar tudo errado.

Aos meus pais: Clóvis e Marionis, por todos os sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar até aqui, não sei se um dia conseguirei retribuir todo esse amor, mas espero que se sintam orgulhosos de mim. Amo vocês mais do que tudo!

Ao meu irmão: Vinícius, pelas risadas, pela parceria e pela inabalável confiança de que eu posso ir muito mais além. Te amo, hermano!

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal: Bruno, Pri, Dany, André, Alexandre, Jéssica, Adrielly, Juliana e Allana (em ordem de hierarquia haha), por toda ajuda nas corridas de gel, nas PCRs, nas purificações, pelas risadas, pelos momentos de descontração e pelas línguas-pretas de vocês.

Aos amigos, estejam na mesma cidade ou a quilômetros de distância: pela parceria de sempre, pela compreensão nos dias que precisava estudar, por me aguentarem (não só nesse período, mas sempre haha) e por serem os melhores que eu poderia ter.

À professora Alexéia: por ser muito mais que uma orientadora, por me receber na sua casa tantas vezes nos finais de semana ou até tarde da noite para discutirmos o trabalho, pelos conselhos e pelo apoio e confiança que sempre teve em mim.

À Dr^a Andrea Alves do Egito: por deixar seus afazeres de lado tantas vezes para me receber em Campo Grande e me auxiliar nas análises do trabalho, pela co-orientação tão importante, pelas risadas e pelo incentivo de sempre.

Ao Dr. Fernando Miranda de Vargas Junior: por me permitir fazer parte desse projeto que é bem maior que esse trabalho, por toda a ajuda oferecida e pela valiosa participação e colaboração nas bancas de qualificação e defesa.

Ao Dr. Kleibe de Moraes Silva: pela paciência e compreensão com tantos imprevistos e por deixar seus afazeres de lado para participar da banca de defesa, com certeza o trabalho ficará muito mais completo com a sua colaboração.

À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD): pelo apoio logístico concedido.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT): pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”
Carl Sagan

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	9
ABSTRACT.....	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – Utilização de marcadores moleculares para estudo de origem materna e paterna em ovinos	
Introdução.....	12
Marcadores moleculares.....	13
DNA mitocondrial.....	14
Cromossomo Y.....	16
Análises filogenéticas.....	18
Referências.....	19
OBJETIVOS	
Geral.....	23
Específicos.....	23
CAPÍTULO I – Identificação de haplogrupos do DNA mitocondrial em ovinos do Mato Grosso do Sul, Brasil	
Resumo.....	26
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Material e métodos.....	29
Resultados.....	31
Discussão.....	32
Conclusão.....	34
Agradecimentos.....	35
Referências.....	35
CAPÍTULO II – Varição do DNA mitocondrial e do cromossomo Y em ovinos do Mato Grosso do Sul, Brasil	
Resumo.....	40
Abstract.....	41
Highlights.....	42
Introdução.....	43
Material e métodos.....	44
Resultados.....	49
Discussão.....	55

Conclusão.....	59
Agradecimentos.....	59
Conflito de interesse.....	59
Referências.....	60
CAPÍTULO III – Análise de polimorfismos no gene mitocondrial ND5 em ovelhas das raças Pantaneira e Crioula	
Resumo.....	66
<i>Abstract</i>	66
Introdução.....	67
Material e métodos.....	68
Resultados.....	69
Discussão.....	72
Agradecimentos.....	73
Conflito de interesse.....	73
Referências.....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
ANEXOS	
I – Normas da revista Genetics and Molecular Biology.....	77
II – Normas da revista Livestock Science.....	81
III – Certificado de aceite de artigo.....	85

RESUMO GERAL

O Brasil possui diversas raças de ovinos, incluindo os animais que se desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonizadores logo após o descobrimento. Ferramentas moleculares e tecnologias recentes têm marcado a descoberta da origem e de processos de domesticação de ampla variedade de espécies, utilizando-se tanto marcadores moleculares genômicos quanto mitocondriais. O primeiro trabalho teve como objetivo aplicar o teste molecular de PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase I com a enzima de restrição *HinfI* para caracterizar molecularmente algumas raças de ovinos utilizadas no Estado do Mato Grosso do Sul em relação aos haplogrupos existentes. DNA de 155 animais das raças de ovinos Pantaneira, Bergamácia, Dorper, White Dorper, Ile de France, Suffolk e Hampshire Down foi extraído de tecido sanguíneo e utilizado em reações de amplificação seguidas de digestão enzimática. Os animais das raças Pantaneira, Bergamácia e Hampshire Down pertenceram ao haplogrupo Europeu, enquanto que 60% da raça White Dorper foi Asiático. As demais raças pertenceram, predominantemente, ao haplogrupo europeu. O segundo trabalho teve como objetivo avaliar a variação existente nas populações de ovinos de seis raças utilizadas no Estado por meio de análises moleculares de genes do DNA mitocondrial e do cromossomo Y, a fim de se investigar a possível origem desses animais e gerar informações sobre a filogenia dos mesmos. O DNA foi extraído de tecido sanguíneo e utilizado em reações de amplificação seguidas de sequenciamento com três marcadores mitocondriais e dois marcadores do cromossomo Y. A análise do DNA mitocondrial mostrou diferenças significativas entre as populações quando comparadas entre si e com sequências obtidas no GenBank. Pela formação dos haplótipos observou-se miscigenação da raça Pantaneira e foi possível sugerir que a origem das populações é européia. O terceiro trabalho teve como objetivo avaliar a variação entre ovinos da raça Pantaneira do Estado e da raça Crioula do Sul do Brasil por meio de análise molecular da região ND5 do DNA mitocondrial. DNA de 19 animais da raça Pantaneira foi extraído e utilizado em reações de amplificação e sequenciamento. Houve grande diferenciação genética entre as raças analisadas o que poderia implicar que elas não são a mesma raça e possivelmente possuem origem diferente. As análises contribuíram para gerar informações a respeito da filogenia de raças de ovinos do Estado do Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: *Ovis aries*, herança materna, raça Pantaneira, sequenciamento, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Brazil has several breeds of sheep, including animals that developed from breeds brought by settlers soon after the discovery. Molecular tools and recent technologies have marked the discovery of the source and domestication processes of a wide variety of species, using both mitochondrial and genomic molecular markers. The aim of the first study was to apply the PCR-RFLP molecular test of mitochondrial gene cytochrome oxidase I with the restriction enzyme *HinfI* to molecularly characterize some sheep breeds used in the State of Mato Grosso do Sul over existing haplogroups. DNA from 155 animals from sheep breeds Pantaneira, Bergamácia, Dorper, White Dorper, Ile de France, Suffolk, Hampshire Down was extracted from blood tissue and used in amplification reactions followed by enzymatic digestion. All animals from the breeds Pantaneira, Bergamácia and Hampshire Down belonged to the European haplogroup, while 60% of the White Dorper breed was Asian. The other breeds belonged predominantly to the European haplogroup. The aim of the second study was to evaluate the variation in populations of sheep from six breeds used in the State by molecular analyzes of mitochondrial DNA and Y chromosome genes, in order to investigate the possible origin of these animals. DNA was extracted from blood tissue and used in amplification reactions followed by sequencing with three mitochondrial markers and two Y chromosome markers. The analysis of mitochondrial DNA showed significant differences in the populations when they were compared between themselves and with the sequences obtained from GenBank. The formation of haplotypes showed miscegenation of the Pantaneira breed and we can suggest that the origin of the populations is considered european. The third study aimed to evaluate the variation among a sheeps from the Pantaneira breed from the State and Crioula breed from Southern Brazil through molecular analysis of ND5 region of the mitochondrial DNA. DNA from 19 animals of Pantaneira breed was extracted and used in amplification and sequencing. There was high genetic differentiation among the two breeds analyzed which may imply that they are not the same breed and possibly have different origin. The analysis helped generate information about phylogeny of the State of Mato Grosso do Sul sheep breeds.

Keywords: *Ovis aries*, maternal heritage, Pantaneira breed, sequencing, PCR-RFLP.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Utilização de marcadores moleculares para estudo de origem materna e paterna em ovinos

INTRODUÇÃO

De acordo com a Pesquisa Pecuária Municipal de 2012, feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população de ovinos no país foi de 16,789 milhões de cabeças naquele ano. Este número indica uma redução deste tipo de rebanho de 5,0% relativamente a 2011, onde o total foi de 17,6 milhões de cabeças. As maiores participações dos animais ocorreram no Nordeste do País (55,5%), ocorrendo a criação em todos os estados, com destaque para a Bahia (16,8%) e Ceará (12,3%). No Sul do País, houve a concentração de 30,0% da criação de ovinos, sendo que 24,4% do efetivo nacional estava no Rio Grande do Sul (IBGE, 2012). A ovinocultura de corte no Brasil possui alto potencial de crescimento visto que a produção atual não atende a demanda de carne do mercado consumidor (IEPEC, 2012) e, por isso, constitui-se uma sólida opção econômica para atender essa demanda (ARO et al., 2007).

O Brasil possui diversas raças de ovinos, incluindo os animais que se desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonizadores logo após o descobrimento. Ao longo dos anos, estes animais estiveram sob ação da seleção natural das condições ambientais e climáticas locais, resultando em raças que hoje são consideradas naturalizadas, localmente adaptadas ou nativas (MARIANTE et al., 1999)

As raças brasileiras naturalizadas são normalmente constituídas de animais pequenos que foram submetidos a seleção artificial e melhoramento genético sustentável, e são pouco especializadas para produção intensiva de leite e/ou carne (PAIVA et al., 2005a). A sobrevivência e a preservação de raças naturalizadas com heranças genéticas importantes foram ameaçadas durante o século XX, quando houve a importação de raças exóticas (principalmente da África e da Europa) (MORAIS, 2001).

Esses animais naturalizados possuem muitas características adaptativas que os fazem úteis para criação e produção como tolerância ou resistência a doenças e parasitas e alta capacidade de adaptação a disponibilidade e qualidade de comida e água sendo, portanto, o resultado de processos de seleção natural de longo prazo (CRISPIM et al., 2012).

Programas de conservação e melhoramento genético direcionado para animais naturalizados são importantes para minimizar problemas de cruzamentos indiscriminados e

endogâmicos entre exemplares de raças locais, permitindo dessa forma que haja conservação genética das mesmas. Assim, há o interesse que sejam feitas melhorias nos sistemas de produção de modo que os produtores utilizem as raças locais de modo eficiente, possibilitando melhor retorno financeiro (NOTTER, 1999). Pesquisas relacionadas às características adaptativas, diversidade genética e origem de diferentes raças são relevantes para os sistemas de produção animal baseados em raças nativas, pois possibilitam a utilização de forma eficiente desses animais e maior sustentabilidade dos recursos naturais.

Genes mitocondriais e Y-específicos que possuem herança exclusivamente materna e paterna, respectivamente (são transmitidos somente por fêmeas ou machos), além de apresentarem, em geral, padrão de herança não Mendeliana, ou seja, não sofrerem eventos de recombinação, podem servir como marcadores genéticos e fornecer informação necessária para verificação de relações filogenéticas, estimação de distâncias genéticas, discriminação de subpopulações assim como para investigar a história biogeográfica (ROSA; PAIVA, 2009).

Análises do DNA mitocondrial (mtDNA) têm fornecido evidência genética para múltiplos eventos de domesticação e revelado a estrutura genética de populações de ovinos ao redor do mundo através da análise da origem materna das mesmas (FERENCAKOVIC, 2012). O exame de linhagens paternas é também essencial em espécies domésticas, uma vez que o controle da reprodução resultou em uma taxa reprodutiva muito mais elevada em machos, e já revelou muitos aspectos da história dos animais domésticos (ROSA; PAIVA, 2009).

Assim, o objetivo dessa revisão foi apresentar alguns dos marcadores moleculares baseados no mtDNA e no cromossomo Y que são utilizados em estudos filogenéticos com ovinos.

Marcadores moleculares

Desde 1980 o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias que facilitam a detecção de polimorfismos no DNA têm mudado o escopo, a resolução e o poder dos estudos genéticos. Essas tecnologias chamadas coletivamente de “marcadores moleculares”, tem se tornado cada vez mais refinadas e tem apresentado grande impacto em várias disciplinas científicas, da biologia evolutiva e genética de populações a diagnósticos médicos e da agricultura (ROSTOKS et al., 2005).

Os marcadores moleculares podem ser considerados qualquer fenótipo molecular derivado de um segmento específico de DNA que corresponda a regiões que são expressas (ou não) no genoma (FERREIRA; GRATTAPLAGLIA, 1996).

DNA mitocondrial

O mtDNA é encontrado nas mitocôndrias, possui formato circular e capacidade de replicação. A herança mitocondrial é também conhecida como herança materna visto que os marcadores moleculares no mtDNA são passados apenas pela fêmea (ao contrário da herança biparental da maioria dos marcadores moleculares). Portanto, devido ao fato de muitos genes do mtDNA serem altamente conservados e possuírem herança materna, os mesmos podem ser usados para elucidar as relações entre indivíduos (filogenia) considerando-se tempos de distância mais longos (OLSON et al., 2013). De acordo com Crispim et al. (2012), cruzamentos indiscriminados entre diferentes raças de ovinos torna sua caracterização por meio de marcadores moleculares nucleares mais difícil, porém a herança materna dos marcadores mitocondriais pode auxiliar a desvendar a origem de diversas raças naturalizadas ao redor do mundo.

O sequenciamento de regiões do mtDNA tem sido usado como ferramenta para determinar a dinâmica de populações e a origem das mesmas como, por exemplo, dos bovinos (LOFTUS et al., 1994), equinos (VILA et al., 2001), suínos (GIUFFRA et al., 2000; LARSON et al., 2005), cabras (JOSHI et al., 2004; SARDINA et al., 2006) e ovinos (WOOD; PHUA, 1996; HIENDLEDER et al., 1998a; GUO et al., 2005; PEDROSA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; TAPIO et al., 2006; MEADOWS et al., 2006).

A importância de análise do mtDNA de ovinos foi mostrada por Wood e Phua (1996) e Hiendleder et al. (1998b) em seus estudos para investigar a hipótese de que diferentes raças de ovelhas selvagens contribuíram para formar as raças modernas por meio de análise filogenética de haplótipos do mtDNA de ovelhas selvagens e domésticas. Nesses estudos foram identificadas duas linhagens maternas para as ovelhas domésticas, sendo denominadas de origem Européia e Asiática, por meio da técnica de sequenciamento da região controle do mtDNA.

Alguns dos marcadores mitocondriais mais utilizados são a região controle (D-loop) e os genes citocromo b (CytB), NADH desidrogenase subunidade 5 (ND5) e citocromo oxidase I (COI ou Cox1) (Figura 1).

A região controle do mtDNA, conhecida como D-loop, é a maior região não codificadora da molécula de DNA mitocondrial animal com papel na replicação e na transcrição da molécula (CLAYTON, 1984, 1992). Em vertebrados, as altas taxas mutacionais dessa região permitem estudos populacionais com divergências recentes e, especificamente na região controle do mtDNA das ovelhas, ocorre uma série variável de repetições em *tandem* de aproximadamente 75 bases que distinguem linhagens com dois até sete blocos em tandem. Esta variação também pode ocorrer no nível individual, caracterizando um evento de heteroplasmia, ou seja, a presença de mais de um tipo de genoma mitocondrial em um mesmo indivíduo (PAIVA, 2005b).

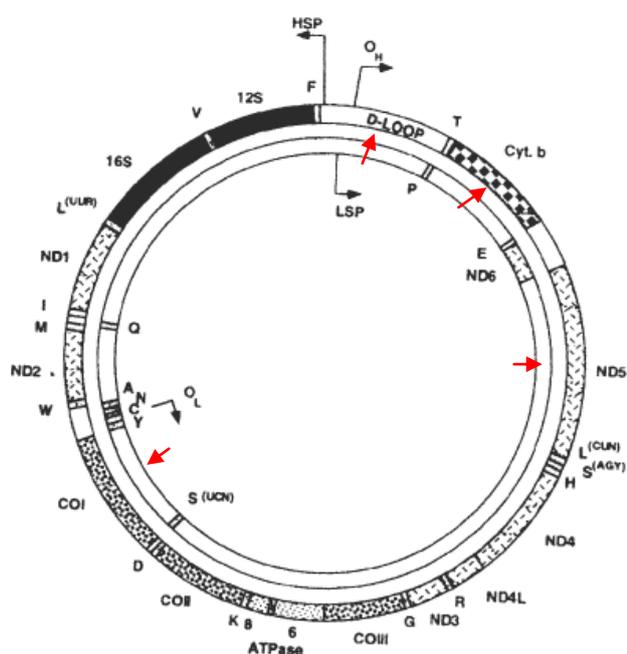


Figura 1 – Representação da molécula circular do DNA mitocondrial. As setas indicam os marcadores mais utilizados para estudos filogenéticos em ovinos: D-loop (região controle), Cyt b (citocromo b), ND5 (NADH desidrogenase subunidade 5) e COI (citocromo oxidase I) (Adaptado de CARVALHO, 2002).

Outro marcador molecular bastante conhecido e utilizado é o gene do citocromo b que é responsável pela síntese da subunidade catalítica central da ubiquinol citocromo c redutase, uma enzima que está presente na cadeia respiratória da mitocôndria e na cadeia respiratória do ciclo foto-redox de muitas bactérias (MEYER, 1994). Todos os organismos eucariotos necessitam desta classe de enzima redox, e consequentemente do citocromo b para a conversão de energia (ORREGO, 2012). Seu uso se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contem sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos, sendo considerado excelente marcador molecular (ORREGO, 2012). Segundo Pedrosa et al. (2005) a região do citocromo b foi

considerada mais exata para calibrar um relógio molecular entre linhagens de mtDNA visto que o seu padrão de evolução é conhecido e relativamente constante entre a maioria dos mamíferos (IRWIN et al., 1991).

A NADH desidrogenase é a primeira enzima da cadeia de transporte eletrônico mitocondrial, catalisando a oxidação do NADH e a redução da coenzima Q. Neste processo, o complexo transloca prótons através da membrana interna, ajudando na criação de gradiente eletroquímico utilizado na produção de ATP. É uma das maiores enzimas encontradas em complexos respiratórios e, em mamíferos, a enzima possui 42 cadeias polipeptídicas sendo que sete são codificadas pelo genoma mitocondrial (VOET; VOET, 2004). A subunidade cinco do NADH desidrogenase (ND5) foi utilizada por Tserenbataa et al. (2004) e por Gonçalves et al. (2010) em estudos de diversidade com ovinos, sendo que no primeiro estudo os autores buscaram encontrar subespécies de *Ovis ammon* na Mongólia por meio do sequenciamento dessa região e os resultados sugeriram a possibilidade da existência de duas subespécies (*O. ammon ammon* e *O. ammon darwini*). E no estudo de Gonçalves et al. (2010), essa região mostrou-se eficiente para diferenciação de animais da raça Crioula nas variedades Serrana e Fronteira, presentes no Sul do Brasil.

O gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI), constituído por curto segmento de 648 pares de bases, foi proposto para identificação molecular de espécie (HEBERT et al., 2003a), (HEBERT et al., 2003b). O estudo dessa região do mtDNA pode ser denominado de DNA *barcoding* onde sequências parciais de DNA do gene COI são utilizadas para identificar e designar tanto espécies novas como previamente descritas, auxiliando a desvendar a diversidade (BOLZAN, 2011).

Cromossomo Y

O cromossomo Y dos mamíferos possui dois componentes: regiões pseudoautosômicas (PAR, do inglês *pseudoautosomal regions*) que pareiam e se recombinam com o cromossomo X e uma região macho-específica do Y (MSY, do inglês *male-specific of the Y*), onde se encontra o gene chamado de região determinante do sexo no cromossomo Y (SRY, do inglês *sex-determining region Y*) (KLUG et al., 2010) (Figura 2). Em animais domésticos, a análise do DNA macho-específico tem se provado altamente eficiente para desvendar o processo de domesticação e desenvolvimento de raça (MEADOWS et al., 2004).

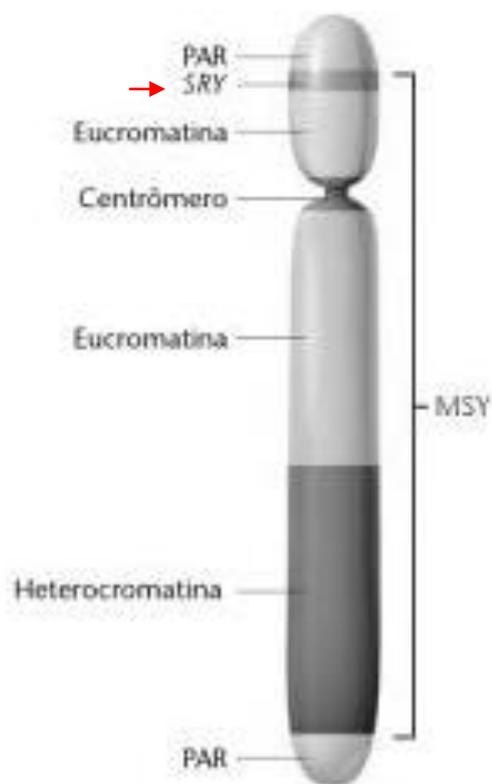


Figura 2 – Representação do cromossomo Y. A seta indica o gene determinante do sexo no cromossomo Y (SRY) (Adaptado de KLUG et al., 2010).

Informações da região MSY tendem a ser particularmente importantes em animais domésticos onde a contribuição de um pequeno número de machos no rebanho costuma ser muito alta durante o desenvolvimento da raça, visto que a herança paterna é renovada pela troca dos reprodutores enquanto que a herança materna continua a mesma. Além disso, a análise do cromossomo Y possibilita revelar a identidade de ancestrais selvagens que foram domesticados para se tornar as raças de hoje (MEADOWS et al., 2004)

A herança haplóide e uniparental de microssatélites e polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) específicos do cromossomo Y fazem com que esses marcadores sejam extremamente sensíveis para detecção da história genética, do processo de domesticação de raças, das relações entre populações e da abundância masculina no fluxo gênico (ONER et al., 2011).

Apesar da importância do estudo da herança paterna em animais domésticos, o número de projetos de pesquisa em ovinos utilizando o cromossomo Y é limitado quando comparado com bovinos (HANOTTE et al., 2000; PEREZ-PARDAL et al., 2010) e cabras (PIDANCIER et al., 2006; SECHI et al., 2009). Apenas um loco de microssatélite (SRYM18) e oito SNPs, localizados na região 5' do promotor do gene SRY foram identificados em ovinos

(MEADOWS et al., 2006; MEADOWS; KIJAS, 2009). Um desses oito SNPs, juntamente com o marcador microssatélite mencionado, foi previamente genotipado em 458 animais domésticos e em 61 indivíduos de quatro espécies selvagens para definir um grupo de 11 haplótipos macho-específicos (MEADOWS et al., 2006).

Análises filogenéticas

Filogenia é o estudo das relações evolutivas entre grupos de organismos, geralmente avaliado por meio de sequenciamento, informações moleculares e morfológicas. A análise filogenética é o método de inferir ou estimar essas relações. A história evolutiva contada pela análise filogenética é normalmente ilustrada como ramificações, diagramas em formato de árvore que representa a relação entre moléculas (“árvores genéticas”), organismos ou ambos (BRINKMAN; LEIPE et al., 2001).

Estudos de variação do mtDNA utilizando-se, principalmente, as regiões controle (D-loop), citocromo b e citocromo oxidase I revelaram a existência de cinco haplogrupos (chamados de HA, HB, HC, HD e HE) em ovelhas domésticas amostradas de diversas regiões geograficamente dispersas. Os haplogrupos HD e HE foram identificados recentemente e são também os mais raros encontrados apenas em ovelhas do Cáucaso e da Turquia, até o momento (TAPIO et al., 2006; MEADOWS et al., 2007). O haplogrupo HC é o segundo com a distribuição mais restrita com exemplares na Ásia, no Fértil Crescente, Cáucaso e na Península Ibérica (GUO et al., 2005; PEDROSA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; TAPIO et al., 2006; MEADOWS et al., 2007). HA e HB são os haplogrupos identificados com maior frequência e agrupam os animais de origem Asiática e Européia, respectivamente. Ambos foram identificados pela primeira vez por Wood e Phua (1996) e classificados por Hiendleder et al. (1998b), mas tem sido localizados em todas as regiões geográficas onde *Ovis aries* foi amostrado.

Diante do exposto, a análise da diversidade genética dos ovinos baseada em marcadores de mtDNA e do cromossomo Y é de grande importância para determinar a origem e compreender a história evolutiva de diferentes raças de modo que seja possível realizar manejo reprodutivo adequado visando a minimização da perda de variabilidade genética e sua conservação, bem como o melhor aproveitamento dos recursos genéticos locais.

REFERÊNCIAS

- ARO, D. T.; POLIZER, K. A.; PENA, S. B. O agronegócio na ovinocultura de corte no Brasil. **Rev Cien Eletro Med Vet**, v. 9, n. 5, p. 1-6, 2007.
- BOLZAN, A. R. **DNA barcode de Drosofilídeos micófagos pertencentes aos gêneros Hirtodrosophila, Mycodrosophila e Zigothrica**. 2011. 85 (Mestrado). Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- BRINKMAN, F. S.; LEIPE, D. D. Phylogenetic analysis. **Methods Biochem Anal**, v. 43, p. 323-358, 2001.
- CLAYTON, D. A. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. **Annu Rev Biochem**, v. 53, n. 1, p. 573-594, 1984.
- _____. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. **Int Rev Cytol**, v. 141, p. 217-232, 1992.
- CRISPIM, B. A. et al. Molecular markers for genetic diversity and phylogeny research of Brazilian sheep breeds. **Afr J Biotechnol**, v. 11, n. 90, p. 15617-15625, 2012.
- CARVALHO, M. F.; RIBEIRO, F. A. Q. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 68, n. 2, p. 268-275, 2002.
- FERENCAKOVIC, M. et al. Mitochondrial DNA and Y-chromosome diversity in East Adriatic sheep. **Anim Genet**, v. 44, n. 2, p. 184-192, 2012.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1996.
- GIUFFRA, E. et al. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.
- GONÇALVES, G. L. et al. Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. **Anim Genet**, v. 41, n. 3, p. 308-310, 2010.
- GUO, J. et al. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). **Anim Genet**, v. 36, n. 4, p. 331-336, 2005.
- HANOTTE, O. et al. Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-saharan African cattle breeds. **Mol Ecol**, v. 9, n. 4, p. 387-396, 2000.
- HEBERT, P. D. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003a.
- HEBERT, P. D.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proc Biol Sci**, v.

270 Suppl 1, p. 96-99, 2003b.

HIENDLEDER, S. et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. **J Mol Evol**, v. 47, n. 4, p. 441-448, 1998a.

HIENDLEDER, S. et al. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. **J Hered**, v. 89, n. 2, p. 113-120, 1998b.

INSTITUTO DE ESTUDOS PECUÁRIOS (IEPEC). 2012. Disponível em: <<http://www.iepec.com>>. Acesso em: 18 abr. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária municipal (PPM)**. 2012. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/d_detalhes.php?id=784>. Acesso em: 18 abr. 2014.

IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **J Mol Evol**, v. 32, n. 2, p. 128-144, 1991.

JOSHI, M. B. et al. Phylogeography and origin of Indian domestic goats. **Mol Biol Evol**, v. 21, n. 3, p. 454-462, 2004.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de genética**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

LARSON, G. et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1618-1621, 2005.

LOFTUS, R. T. et al. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 7, p. 2757-2761, 1994.

MARIANTE, A. D. S. et al. Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. **AGRI**, v. 25, n. 1, p. 107-121, 1999.

MEADOWS, J. R.; HAWKEN, R. J.; KIJAS, J. W. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. **Anim Genet**, v. 35, n. 5, p. 379-385, 2004.

MEADOWS, J. R. et al. Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. **Anim Genet**, v. 37, n. 5, p. 444-453, 2006.

MEADOWS, J. R. et al. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1371-1379, 2007.

MEADOWS, J. R.; KIJAS, J. W. Re-sequencing regions of the ovine Y chromosome in domestic and wild sheep reveals novel paternal haplotypes. **Anim Genet**, v. 40, n. 1, p. 119-123, 2009.

MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trends Ecol Evol**, v. 9, n. 8, p. 278-280, 1994.

MORAIS, O. R. O. O melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: PEREIRA, J. C. C. (Ed.). **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMUZ Editora, 2001.

NOTTER, D. R. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. **J Anim Sci**, v. 77, n. 1, p. 61-69, 1999.

OLSON, Z. H.; WHITTAKER, D. G.; RHODES, O. E. Translocation history and genetic diversity in reintroduced bighorn sheep. **J Wildl Manage**, v. 77, n. 8, p. 1553-1563, 2013.

ONER, Y.; CALVO, J.; ELMACI, C. Y chromosomal characterization of Turkish native sheep breeds. **Livest Sci**, v. 136, n. 2, p. 277-280, 2011.

ORREGO, L. E. O. **Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae)**. . 2012. 79 (Mestrado). Instituto de Biocências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PAIVA, S. R. et al. Origin of the main locally adapted sheep breeds of Brazil: A RFLP-PCR molecular analysis. **Arch Zootec**, v. 54, p. 4, 2005a.

PAIVA, S. R. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**. 2005b. 118 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PEDROSA, S. et al. Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. **Proc Biol Sci**, v. 272, n. 1577, p. 2211-2217, 2005.

PEREIRA, F. et al. Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 7, p. 1420-1426, 2006.

PEREZ-PARDAL, L. et al. Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos taurus*) cattle. **Anim Genet**, v. 41, n. 3, p. 232-241, 2010.

PIDANCIER, N. et al. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. **Mol Phylogenet Evol**, v. 40, n. 3, p. 739-749, 2006.

ROSA, A. D. M.; PAIVA, S. **Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009.

ROSTOKS, N. et al. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. **Mol Genet Genomics**, v. 274, n. 5, p. 515-527, 2005.

SARDINA, M. T. et al. Phylogenetic analysis of Sicilian goats reveals a new mtDNA lineage. **Anim Genet**, v. 37, n. 4, p. 376-378, 2006.

SECHI, T. et al. Genetic variation of goat Y chromosome in the Sardinian population. **Ital J Anim Sci**, v. 8, n. 2s, p. 159-161, 2009.

TAPIO, M. et al. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central

Asian areas. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 9, p. 1776-1783, 2006.

TSERENBATAA, T. et al. A population genetic comparison of argali sheep (*Ovis ammon*) in Mongolia using the ND5 gene of mitochondrial DNA; implications for conservation. **Mol Ecol**, v. 13, n. 5, p. 1333-1339, 2004.

VILA, C. et al. Widespread origins of domestic horse lineages. **Science**, v. 291, n. 5503, p. 474-477, 2001.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 3 ed. John Wiley and Sons, 2004.

WOOD, N. J.; PHUA, S. H. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. **Anim Genet**, v. 27, n. 1, p. 25-33, 1996.

OBJETIVOS

Geral

- Gerar informações referentes à filogenia de ovinos de algumas fazendas do Estado do Mato Grosso do Sul com base em análises moleculares de genes do DNA mitocondrial e do cromossomo Y.

Específicos

- Identificar a possível origem de ovinos utilizadas no Estado do Mato Grosso do Sul através da comparação com sequências referência do GenBank;
- Avaliar a variabilidade do DNA mitocondrial e do cromossomo Y nas diferentes raças analisadas;
- Fornecer subsídios para o reconhecimento da raça Pantaneira junto à associação nacional de criadores através de comparação com sequências da raça Crioula do Sul do Brasil;
- Determinar a diversidade e a distância genética entre as raças pelas análises do DNA mitocondrial e do cromossomo Y;
- Determinar o número de haplótipos e construir redes haplotípicas mostrando a relação entre as raças.

CAPITULO I

A revista em que se pretende publicar este artigo é a **Genetics and Molecular Biology**, avaliada com **Qualis B2** na área de **Biodiversidade**. Normas da revista em anexo (Anexo I).

1 **Identificação de haplogrupos em DNA mitocondrial de ovinos do**

2 **Mato Grosso do Sul, Brasil**

3
4 Joyce Azambuja de Oliveira¹, Alexandre Campos Banari¹, Bruno do Amaral Crispim²,
5 Fernando Miranda de Vargas Junior³, Andrea Alves do Egito⁴, Alexéia Barufatti Grisolia¹

6
7 ¹ Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados,
8 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

9 ² Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados,
10 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

11 ³ Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato
12 Grosso do Sul, Brasil.

13 ⁴ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

14
15 **Haplogrupos em ovinos do Mato Grosso do Sul**

16
17 **Palavras-Chave:** *Ovis aries*, raça Pantaneira, herança materna, citocromo oxidase I.

18
19 **Autor correspondente:**

20 Joyce Azambuja de Oliveira.

21 Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

22 Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Cidade Universitária. Dourados/MS. Brasil.

23 E-mail: joyce_azambuja@hotmail.com

24
25
26
27

28

RESUMO

29 Marcadores mitocondriais são úteis para análises filogeográficas porque as sequências dos
30 genes são extremamente conservadas e possibilitam a reconstrução da linhagem genética das
31 populações. Pesquisas em regiões do DNA mitocondrial de *Ovis aries* mostraram a existência
32 de haplogrupos de origem asiática e européia. Assim o objetivo do presente estudo foi aplicar
33 o teste molecular de PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase I com a enzima de
34 restrição *HinfI* para caracterizar, em relação aos haplogrupos existentes, algumas raças de
35 ovinos criadas no Estado do Mato Grosso do Sul. Foram analisadas amostras de DNA de 155
36 animais pertencentes a sete raças de ovinos (Pantaneira, Bergamácia, Dorper, White Dorper,
37 Ile de France, Suffolk e Hampshire Down). Os resultados indicaram que 139 animais
38 pertenciam ao haplogrupo europeu, evidenciando a origem europeia das raças criadas no MS.
39 Todos os animais das raças Pantaneira, Bergamácia e Hampshire Down pertenceram apenas
40 ao haplogrupo europeu, enquanto que 60% dos animais da raça White Dorper foram asiáticos.
41 As informações encontradas nesse estudo corroboram com os conhecimentos existentes
42 referentes à história de domesticação dos ovinos e a identificação da origem dos animais
43 pertencentes a algumas das raças do Estado é importante, pois possibilita melhorar o manejo
44 das populações localmente adaptadas visando sua conservação e o seu aproveitamento no
45 Estado.

46

47

ABSTRACT

48 Mitochondrial markers are useful in phylogeographic analysis because gene sequences are
49 extremely conserved and allow the reconstruction of population's genetic lineage. Research
50 conducted in different regions of the mitochondrial DNA of *Ovis aries* showed the existence
51 of asian and european haplogroups. The present study aimed to apply the PCR-RFLP
52 molecular test of mitochondrial gene cytochrome oxidase I with the restriction enzyme *HinfI*

53 to molecularly characterize, over the existing haplogroups, some sheep breeds used in the
54 State of Mato Grosso do Sul. DNA from 155 animals belonging to seven sheep breeds
55 (Pantaneira, Bergamácia, Dorper, White Dorper, Ile de France, Suffolk, Hampshire Down)
56 was analyzed. The results indicated that 139 animals were identified as belonging to the
57 european haplogroup, highlighting the european origin of the State breeds. All animals from
58 the breeds Pantaneira, Bergamácia and Hampshire Down belonged to the european
59 haplogroup, while 60% of the White Dorper breed was asian. The information found in this
60 study corroborate with existing knowledge regarding the history of domestication of sheep
61 and origin identification of the animals belonging to some breeds from the State is important
62 because it allows a better management of the locally adapted populations aiming its
63 conservation and better using in the State.

64

65 **Keywords:** *Ovis aries*, Pantaneira breed, maternal heritage, citochrome oxidase I.

66

67 **Introdução**

68 O Brasil possui diversas raças de ovinos, incluindo os animais que se desenvolveram a
69 partir de raças trazidas pelos colonizadores logo após o descobrimento. Ao longo dos anos,
70 estes animais estiveram sob ação da seleção natural das condições ambientais e climáticas
71 locais, resultando em raças que hoje são consideradas naturalizadas, localmente adaptadas ou
72 nativas (MARIANTE *et al.*, 1999), porém poucos estudos foram realizados no intuito de
73 descobrir a origem desses animais.

74 Quatro grandes grupos de ovelhas selvagens da Eurásia, mouflon (*Ovis orientalis* e
75 *Ovis musimon*), urial (*Ovis vignei*), argali (*Ovis ammon*) e bighorn (*Ovis canadensis*) foram
76 propostos como ancestrais da ovelha doméstica (*Ovis aries*) ou acredita-se que tenham
77 contribuído para formação de raças específicas (HIENDLEDER *et al.*, 2002). Reed (1960)

78 sugeriu que evidências arqueológicas apontam para a mouflon asiática (*Ovis orientalis*) como
79 a ancestral da ovelha doméstica que se encontra distribuída por todo o mundo. Ryder (1991)
80 sugeriu que é mais provável que a mouflon tenha contribuído para o desenvolvimento de
81 ovelhas domésticas européias, a urial e a argali para as asiáticas enquanto que a bighorn nunca
82 foi domesticada.

83 Wood e Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998a), a partir do sequenciamento da região
84 controle (D-loop) do DNA mitocondrial (mtDNA), demonstraram a existência de pelo menos
85 dois grandes haplogrupos na espécie *Ovis aries*: um de origem européia e outro,
86 provavelmente, de origem asiática. Esses resultados também podem ser interpretados como
87 dois eventos de domesticação independentes que ocorreram para as espécies domésticas
88 (BRUFORD *et al.*, 2003). Além desses estudos, Hiendleder *et al.* (1999) desenvolveram um
89 teste diagnóstico baseado na reação em cadeia pela polimerase, do inglês *Polymerase Chain*
90 *Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) do gene citocromo
91 oxidase I (COI ou Cox1) com a enzima de restrição *HinfI* (extraída da bactéria *Haemophilus*
92 *influenza* Rf) com o objetivo de identificar mais facilmente esses dois haplogrupos que foram
93 denominados de HA (origem asiática) e HB (origem européia).

94 Os marcadores mitocondriais são úteis para análises filogeográficas porque as
95 sequências de genes ou regiões mitocondriais são muito conservadas, possibilitando a
96 reconstrução da linhagem genética das populações (CUNHA & SOLÉ-CAVA, 2012). A
97 região de 648 pares de bases do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) foi utilizada
98 para identificação molecular de espécie (HEBERT *et al.*, 2003a, 2003b). O estudo dessa
99 região do mtDNA, que pode ser denominado de DNA *barcoding*, utiliza sequências parciais
100 de DNA do gene COI para identificar e designar tanto espécies novas como previamente
101 descritas, auxiliando a desvendar a diversidade (BOLZAN, 2011).

102 Assim sendo, não apenas para a identificação molecular de espécie como também para
103 a área de produção animal é de grande interesse a utilização de marcador mitocondrial para
104 analisar a participação dos haplótipos na formação dos rebanhos das raças ovinas. Diante do
105 exposto, o presente estudo teve como objetivo utilizar o teste molecular de PCR-RFLP do
106 gene mitocondrial citocromo oxidase I com a enzima de restrição *HinfI* para caracterizar
107 molecularmente, em relação aos haplogrupos, algumas raças de ovinos utilizadas no Estado
108 do Mato Grosso do Sul.

109

110 **Material e métodos**

111 **Animais e coleta de sangue**

112 Amostras de sangue de 155 animais, pertencentes a sete raças de ovinos criadas no
113 Estado do Mato Grosso do Sul, foram coletadas por punção da veia jugular em tubos para
114 coleta de sangue (Vacutainer[®]) de 4,5 mL, contendo anticoagulante K3 EDTA. As amostras
115 foram mantidas sob refrigeração até a realização da extração do DNA. Os locais de origem de
116 cada raça e o número de animais estão descritos na Tabela 1.

117

118 **Extração de DNA e quantificação**

119 A extração de DNA foi realizada utilizando protocolo de extração de DNA de sangue
120 total descrito por Crispim *et al.* (2012).

121 Os dados referentes à quantidade de DNA (ng/μL) e qualidade (razão de 260/280 nm)
122 foram obtidos por meio de espectrofotometria e a integridade foi observada por meio de
123 eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

124

125 **PCR-RFLP do gene COI**

126 Os *primers* COIF (5'-CAGAGTTTGAAGCTGCT-3') e COIR (5'-
 127 AGCTGACGTGAAGTAAGC-3') descritos por Hiendleder et al. (1999), com base na
 128 sequência depositada no GenBank sob o número de acesso AF010406.1 (HIENDLEDER *et*
 129 *al.*, 1998b), foram utilizados para amplificar um fragmento de 1053 pares de bases (pb) do
 130 gene COI. Este fragmento contém o sítio polimórfico, previamente identificado por
 131 sequenciamento pelo mesmo autor, da enzima *HinfI* nas posições 5562-5566 e dois sítios
 132 adicionais da mesma enzima localizados nas posições 6038-6042 e 6182-6186.

133 A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi realizada em um volume final de 25 µL e a
 134 mistura para amplificação constituiu-se de: 7,5 µL de água ultra-pura, 1,5 µL de cada primer
 135

136 Tabela 1 – Raças utilizadas no experimento, quantidade de animais e local de coleta.

Raça	Número de animais	Local de Coleta*
Pantaneira (PT)	40	Faz. Experimental UFGD – Dourados/MS; Embrapa Corumbá/MS
Bergamácia Brasileira (BE)	21	Retiro dos Leite – Jardim/MS
Ile de France (IF)	20	Faz. Chancan – Campo Grande/MS
Dorper (DP)	19	Cabanha Morena – Caarapó/MS
White Dorper (WD)	15	Cabanha Morena – Caarapó/MS
Hampshire Down (HS)	20	Faz. Mate Laranjeira – Ponta Porã/MS
Suffolk (SF)	20	Cabanha LCL – Caarapó/MS
Total	155	

137 *O material dos animais da raça Pantaneira foi coletado de rebanhos de duas fazendas distintas, porém verificou-se que não havia diferença genética entre eles e,
 138 por isso, foram analisados como um grupo só. Ambos os rebanhos onde foi feita a coleta eram formados por animais adquiridos de diversos locais.
 139

140

141 (10 pmoles), 12,5 µL de PCR Master Mix (Fermentas[®]), 2,0 µL de DNA (10-20ng).
142 As reações de PCR foram realizadas no termociclador BIORAD nas seguintes condições:
143 desnaturação inicial a 94° C por 5 min, amplificação a 94 °C por 30s, 57 °C por 1 min, 72 °C
144 por 1 min (37 ciclos) e extensão final a 72 °C por 5 min.

145 A reação de digestão com a endonuclease de restrição foi composta de 10 µL de água
146 ultra-pura, 1,5 µL de tampão 10, 0,2 µL (10U/µL) da enzima *HinfI* e 10 µL do produto
147 amplificado. A digestão foi realizada em termociclador a 37 °C por 2 horas e os fragmentos
148 foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de
149 etídeo.

150

151 **Resultados**

152 Um fragmento de 1053 pb foi obtido da PCR do gene COI, conforme mostra a Figura
153 1A. Os fragmentos resultantes da reação de digestão foram analisados de acordo com os
154 resultados encontrados por Hiendleder *et al.* (1999) sendo que a existência do fragmento de
155 836 pb representou os animais de origem asiática (HA) e dois fragmentos de 477 pb e 359 pb,
156 os animais de origem européia (HB) (Figura 1B).

157 Também foram observados fragmentos menores de 144 pb e 73 pb no gel que se
158 tratavam de sítios adicionais de digestão da enzima, porém esses fragmentos foram
159 considerados polimorfismos não-diagnósticos e não foram incluídos nas análises (Hiendleder
160 *et al.*, 1999).

161 Do total de 155 animais, 16 foram identificados como pertencentes a HA,
162 representados pelas raças Ile de France (n=3), Dorper (n=2), White Dorper (n=9) e Suffolk
163 (n=2). Os outros 139 animais foram identificados como pertencentes à HB, representantes das
164 raças Pantaneira (n=40), Bergamácia Brasileira (n=21), Ile de France (n=17), Dorper (n=17),
165 White Dorper (n=6), Hampshire Down (n=20) e Suffolk (n=18).

166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185

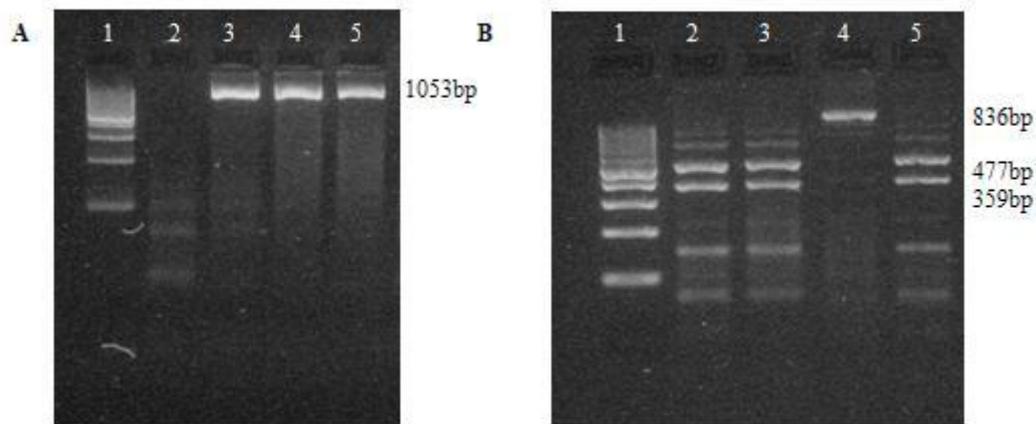


Figura 1 – **A** Eletroforese em gel de agarose 2% dos fragmentos da PCR do gene COI do DNA mitocondrial. Linha 1= marcador molecular de 100 pb (Thermo Scientific[®]). Linha 2 = controle negativo. Linhas 3 a 5 = fragmento de 1053 pb; **B** Eletroforese em gel de agarose 2% dos fragmentos da PCR-RFLP produzidos pela enzima de restrição *HinfI* no gene COI do DNA mitocondrial. Linha 1 = marcador molecular de 100pb (Thermo Scientific[®]). Linhas 2, 3 e 5 = animais de origem Européia (HB) (fragmentos de 477 e 359 pb). Linha 4 = animais de origem Asiática (HA) (fragmento de 836 pb).

186 **Discussão**

187 Estudos de variação do mtDNA utilizando-se, principalmente, as regiões controle (D-
188 loop), citocromo b e citocromo oxidase I revelaram a existência de cinco haplogrupos
189 (chamados de HA, HB, HC, HD e HE) em ovelhas domésticas de diversas regiões
190 geograficamente dispersas. Os haplogrupos HD e HE foram identificados recentemente e são
191 também os mais raros encontrados apenas em ovelhas do Cáucaso e da Turquia, até o
192 momento (TAPIO *et al.*, 2006; MEADOWS *et al.*, 2007). O haplogrupo HC é o segundo com
193 a distribuição mais restrita com exemplares na Ásia, no Fértil Crescente, Cáucaso e na
194 Península Ibérica (GUO *et al.*, 2005; PEDROSA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2006; TAPIO
195 *et al.*, 2006; MEADOWS *et al.*, 2007). HA e HB são os haplogrupos identificados com maior
196 frequência e agrupam os animais de origem Asiática (*Ovis orientalis*) e Européia (*Ovis
197 musimon*), respectivamente. Ambos foram identificados pela primeira vez por Wood e Phua
198 (1996) e classificados por Hiendleder *et al.* (1998b), mas tem sido localizados em todas as
199 regiões geográficas onde *Ovis aries* foi amostrado.

200 A maioria dos animais (n=139) foi identificada como sendo do haplogrupo HB, ou
201 seja, de origem Européia sendo que para as raças Pantaneira, Bergamácia e Hampshire Down
202 todos os animais analisados pertenceram a este haplogrupo, fato que pode ser possivelmente
203 justificado pela colonização do Brasil. Como os ovinos são produtores de lã e carne, era
204 comum que fossem levados em longas viagens com os colonizadores e, processos adaptativos
205 e de seleção natural, resultaram na formação de diversas raças de ovinos localmente
206 adaptados pelo território brasileiro (PAIVA *et al.*, 2005). A presença do haplogrupo Europeu
207 pode ser detectada nesses animais pelo fato do gene COI ser muito conservado e possuir
208 herança materna.

209 Os animais das raças exóticas, importados pelo Brasil no início do século XX, Dorper,
210 White Dorper, Ile de France e Suffolk pertenceram aos dois haplogrupos: HA (n=16) e HB
211 (n=58). A raça White Dorper foi a única que teve mais animais do haplogrupo Asiático do
212 que do haplogrupo Europeu, sendo nove do total de 15 (60%). Esta raça, assim como a
213 Dorper, é oriunda da África do Sul sendo o resultado do cruzamento entre a raça exótica
214 Dorset Horn (oriunda do sudoeste da Inglaterra) e a adaptada Blackhead Persian (oriunda da
215 África do Sul, conhecida no Brasil como Somalis). A raça Blackhead Persian é africana,
216 porém acredita-se que a raça que deu origem a ela tenha sido a asiática Urial (*Ovis vignei*)
217 (PAIVA *et al.*, 2011). Sabe-se que os animais das raças Dorper e White Dorper chegaram ao
218 Brasil através da importação de embriões e, esse fato pode ter colaborado para a observação
219 de maior quantidade de indivíduos de ancestralidade asiática quando comparado às demais
220 raças.

221 Portanto, todos os animais das raças Pantaneira, Bergamácia e Hampshire Down
222 pertenceram ao haplogrupo europeu, enquanto que 60% da raça White Dorper foi asiático.
223 Com exceção dos animais da raça Pantaneira, as coletas dos animais das demais raças

224 analisadas foram feitas todas em rebanhos únicos o que pode ter influenciado os resultados
225 encontrados.

226 As informações encontradas nesse estudo corroboram com os conhecimentos
227 existentes referentes à história de domesticação dos ovinos. Esses animais estão entre os
228 primeiros a ser domesticados pela humanidade e, essa domesticação, tem sua data estimada
229 entre nove e onze mil anos atrás na Mesopotâmia (atual território do Iraque) (ENSMINGER
230 & PARKER, 1986; KREBS, 2003; SIMMONS & EKARIUS, 2010). Os ovinos entraram no
231 continente africano não muito depois da sua domesticação no oeste da Ásia (BLENCH &
232 MACDONALD, 2000). Inicialmente, as ovelhas eram criadas apenas para produção de carne,
233 leite e couro. Evidências arqueológicas de estátuas encontradas no Irã sugeriram que a seleção
234 para o surgimento de ovelhas lanadas pode ter começado por volta de 6000 a.C. e assim, com
235 o começo do comércio da lã das ovelhas, elas passaram a ser importadas para África e Europa
236 como troca (ENSMINGER & PARKER, 1986).

237 A identificação da origem dos ovinos pertencentes a algumas das raças presentes no
238 Estado do Mato Grosso do Sul é importante, pois estes fazem parte do patrimônio genético do
239 Estado e conhecendo sua filogenia é possível melhorar o manejo dessas raças visando sua
240 conservação e assim o melhor aproveitamento da produtividade desses animais de origem, em
241 sua maioria, européia no nosso ambiente.

242

243 **Conclusão**

244 O teste molecular de PCR-RFLP de parte do gene COI com a enzima de restrição
245 *HinfI* indicou a aplicabilidade dessa ferramenta molecular para classificar os animais,
246 representantes de algumas das raças de ovinos criadas no Estado do Mato Grosso do Sul,
247 como sendo parte de HB (origem européia) e o restante dos animais como parte de HA
248 (origem asiática).

249 **Agradecimentos**

250 À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio logístico concedido
251 e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
252 do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

253

254 **Referências**

255

256 Blench RM e MacDonald KC (2000) The origins and development of African livestock:
257 archaeology, genetics, linguistics and ethnography. Routledge.

258

259 Bolzan AR (2011) DNA barcode de Drosophilídeos micófagos pertencentes aos gêneros
260 Hirtodrosophila, Mycodrosophila e Zigothrica. 85f (Mestrado). Centro de Ciências Naturais e
261 Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

262

263 Brown WM, Prager EM, Wang A e Wilson AC (1982) Mitochondrial DNA sequences of
264 primates: tempo and mode of evolution. J Mol Evol 18:225-239.

265

266 Bruford MW, Bradley DG e Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of
267 livestock domestication. Nat Rev Genet 4:900-910.

268

269 Cunha HA e Solé-Cava AM (2012) Análise filogeográfica. In: Matioli SR e Fernandes FMC
270 (eds) Biologia Molecular e Evolução. 2ª edição. Holos Editora/Sociedade Brasileira de
271 Genética, Ribeirão Preto, pp 197-215.

272

273 Ekarius C e Simmons P (2010) Storey's Guide to Raising Sheep. Storey Publishing. 438p.

274 Ensminger ME e Parker R (1986) Sheep & goat science. The Interstate Printers & Publishers
275 Inc,643p.
276

277 Guo J, Du LX, Ma YH, Guan WJ, Li HB, Zhao QJ, Li X e Rao SQ (2005) A novel maternal
278 lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). Anim Genet 36:331-336.
279

280 Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR (2003a) Biological identifications through
281 DNA barcodes. Proc Biol Sci 270:313-321.
282

283 Hebert PD, Ratnasingham S e Dewaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c
284 oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci 270:S96-99.
285

286 Hiendleder S, Mainz K, Plante Y e Lewalski H (1998a) Analysis of mitochondrial DNA
287 indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no
288 evidence for contributions from urial and argali sheep. J Hered 89:113-120.
289

290 Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R e Janke A (1998b) The complete mitochondrial
291 DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine
292 haplotype. J Mol Evol 47:441-448.
293

294 Hiendleder S, Phua SH e Hecht W (1999) A diagnostic assay discriminating between two
295 major *Ovis aries* mitochondrial DNA haplogroups. Anim Genet 30:211-213.
296

297 Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R e Janke A (2002) Molecular analysis of wild and
298 domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from

299 two different subspecies. *Proc Biol Sci* 269:893-904.

300

301 Krebs RE e Krebs CA (2003) Groundbreaking scientific experiments, inventions, and
302 discoveries of the ancient world. Greenwood Publishing Group, 400p.

303

304 Mariante AS, Albuquerque MSM, Egito AA e McManus C (1999) Advances in the Brazilian
305 animal genetic resources conservation programme. *AGRI* 25:107-121.

306

307 Meadows JRS, Cemal I, Karaca O, Gootwine E e Kijas JW (2007) Five ovine mitochondrial
308 lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics* 175:1371-1379.

309

310 Paiva SR, Silvério VC, Paiva DAF, McManus C, Egito AA, Mariante AS, Castro SR,
311 Albuquerque MSM e Dergam JA (2005) Origin of the main locally adapted sheep breeds of
312 Brazil: A RFLP-PCR molecular analysis. *Arch Zootec* 54:395-399.

313

314 Paiva SR, Facó O, Faria DA, Lacerda T, Barretto GB, Carneiro PLS, Lobo RNB, McManus C
315 (2011) Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources:
316 the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop Anim Health Prod* 43:1449-1457.

317

318 Pedrosa S, Uzun M, Arranz JJ, Gutiérrez-Gil B, Primitivo FS e Bayón Y (2005) Evidence of
319 three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc*
320 *Biol Sci* 272:2211-2217.

321

322 Pereira F, Davis SJM, Pereira L, McEvoy B, Bradley DG e Amorim A (2006) Genetic
323 signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol Biol Evol*

324 23:1420-1426.

325

326 Reed C. (1960) A review of the archaeological evidence on animal domestication in the
327 prehistoric Near East. In: Braidwood RJ e Howe B (eds) Prehistoric investigations in Iraqi
328 Kurdistan: Studies in ancient Oriental civilization. University of Chicago Press, The Oriental
329 Institute of the University of Chicago, pp 119-141.

330

331 Ryder ML (1991) Domestication, history and breed evolution. In: Kalle M (ed) Genetic
332 Resource of Pig, Sheep and Goat. World Animal Series B8, Elsevier Science Publishers,
333 Amsterdam, pp 157-177.

334

335 Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, C'Inkulov M, Gonzarenko G, Kiselyova T, Murawski M,
336 Viinalass H e Kantanen J (2006) Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian,
337 and Central Asian areas. Mol Biol Evol 23:1776-1783.

338

339 Wood NJ e Phua SH (1996) Variation in the control region sequence of the sheep
340 mitochondrial genome. Anim Genet 27:25-33.

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375

CAPITULO II

376

377

378

379

A revista em que se pretende publicar este artigo é a **Livestock Science**, avaliada com **Qualis A2** na área de **Biodiversidade**. Normas da revista em anexo (Anexo II).

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397 **Variação do DNA mitocondrial e do cromossomo Y em raças de ovinos do**

398 **Mato Grosso do Sul, Brasil**

399

400 Joyce Azambuja de Oliveira^{1,*}, Bruno do Amaral Crispim¹, Fernando Miranda de Vargas

401 Junior², Leonardo de Oliveira Seno², Andrea Alves do Egito³, Alexéia Barufatti Grisolia¹

402 ¹Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande

403 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

404 ²Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso

405 do Sul, Brasil.

406 ³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

407

408 *Autor correspondente:

409 Joyce Azambuja de Oliveira

410 Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande

411 Dourados, Rodovia Dourados-Itahum Km 12, Dourados/MS, Brasil.

412 Email: joyce_azambuja@hotmail.com

413 Tel: +55 067 9971-3503

414

415 **RESUMO**

416 A caracterização da diversidade das raças naturalizadas, a relação genética entre elas, bem

417 como o conhecimento de suas origens em outras raças constituem o passo inicial para

418 obtenção de subsídios para programas de melhoramento, manejo e conservação para as raças

419 de ovinos naturalizados brasileiros. Ferramentas moleculares e tecnologias recentes têm

420 marcado a descoberta da origem e de processos de domesticação de ampla variedade de

421 espécies, utilizando-se tanto marcadores moleculares genômicos quanto mitocondriais. Até o

422 momento não existem trabalhos relatando a filogenia das raças naturalizadas e exóticas do
423 Estado do Mato Grosso do Sul, portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação
424 existente nas populações de ovinos pertencentes a seis raças utilizadas no Estado por meio de
425 análises moleculares de genes do DNA mitocondrial e do cromossomo Y, a fim de se
426 investigar a possível origem desses animais e assim gerar informações sobre a filogenia dos
427 mesmos. DNA de seis raças de ovinos (Pantaneira, Bergamácia, Dorper, White Dorper, Ile de
428 France e Hampshire Down) foi extraído de tecido sanguíneo e utilizado em reações de
429 amplificação seguidas de sequenciamento com três marcadores mitocondriais e dois
430 marcadores do cromossomo Y. A análise do DNA mitocondrial permitiu inferir um primeiro
431 panorama sobre relações filogenéticas nas populações de ovinos do Estado do Mato Grosso
432 do Sul, bem como diferenças significativas entre as mesmas quando comparadas entre si e
433 com sequências obtidas no GenBank. Pela formação dos haplótipos observou-se miscigenação
434 da raça Pantaneira e foi possível sugerir que a origem das populações de ovinos do Estado do
435 Mato Grosso do Sul analisadas seja européia.

436

437 **Palavras-Chave:** *Ovis aries*, sequenciamento, raça Pantaneira, herança materna, herança
438 paterna.

439

440

ABSTRACT

441 The characterization of the diversity of naturalized breeds, the genetic relationship between
442 them, as well as knowledge of their origins in other breeds constitute the initial step to
443 obtaining grants for improvement, management and conservation programs for breeds of
444 Brazilian naturalized sheep. Molecular tools and recent technologies have marked the
445 discovery of the source and domestication processes of a wide variety of species, using both
446 mitochondrial and genomic molecular markers. There are no researches about the phylogeny

447 of the naturalized and exotic breeds from the State of Mato Grosso do Sul so far, therefore the
448 aim of this study was to evaluate the variation in populations of sheep from six breeds used in
449 the State by molecular analyzes of mitochondrial DNA and Y chromosome genes, in order to
450 investigate the possible origin of these animals and generate information about their
451 phylogeny. DNA from six sheep breeds (Pantaneira, Bergamácia, Dorper, White Dorper, Ile
452 de France and Hampshire Down) was extracted from blood tissue and used in amplification
453 reactions followed by sequencing with three mitochondrial markers and two Y chromosome
454 markers. The analysis of mitochondrial DNA allowed a first look on phylogenetic relations of
455 sheep populations from the State of Mato Grosso do Sul, as well as significant differences
456 when they were compared between themselves and with the sequences obtained from
457 GenBank. The formation of haplotypes showed miscegenation of the Pantaneira breed and we
458 can suggest that the origin of sheep populations in the State of Mato Grosso do Sul is
459 considered european.

460

461 **Keywords:** *Ovis aries*, sequencing, Pantaneira breed, maternal heritage, paternal heritage.

462

463 **Highlights**

- 464 • Nós avaliamos a variação molecular existente em seis raças de ovinos do Mato Grosso do
465 Sul.
- 466 • A análise com DNA mitocondrial indicou diferenças significativas entre as diferentes
467 raças.
- 468 • A formação dos haplótipos possibilitou sugerir que a origem das populações analisadas
469 seja europeia.

470

471

472 **Introdução**

473 O Brasil possui diversas raças de ovinos, incluindo os animais que se desenvolveram a partir
474 de raças trazidas pelos colonizadores logo após o descobrimento. Ao longo dos anos, estes
475 animais estiveram sob ação da seleção natural das condições ambientais e climáticas locais,
476 resultando em raças que hoje são consideradas naturalizadas, localmente adaptadas ou nativas
477 (Mariane et al., 1999).

478 Desta forma, a caracterização da diversidade das raças naturalizadas, a relação genética entre
479 elas, bem como o conhecimento de suas origens em outras raças constituem o passo inicial
480 para obtenção de subsídios para programas de melhoramento, manejo e conservação para as
481 raças de ovinos naturalizados brasileiros (Paiva, 2005a).

482 Ferramentas moleculares e tecnologias recentes têm marcado a descoberta da origem e de
483 processos de domesticação de ampla variedade de espécies, utilizando-se tanto marcadores
484 moleculares genômicos quanto mitocondriais. Essas ferramentas têm auxiliado a compreensão
485 das relações evolutivas, taxonomias, demografia de várias espécies e forneceram suporte para
486 identificação de áreas mais importantes para programas de preservação, além de auxiliar na
487 análise da diversidade genética em espécies domésticas, selvagens e ameaçadas de extinção
488 (Rosa e Paiva, 2009; Grisolia e Moreno-Cotulio, 2012).

489 O mtDNA mostra a diversidade haplotípica dentro das espécies, portanto se torna ferramenta
490 útil para estabelecer relações filogenéticas de espécie (Avise et al., 1987). Por outro lado, a
491 herança haplóide e uniparental de marcadores específicos do cromossomo Y faz com que os
492 mesmos sejam extremamente sensíveis para detecção da história genética, do processo de
493 domesticação de raças, das relações entre populações e da abundância masculina no fluxo
494 gênico (Oner et al., 2011).

495 Segundo Bruford et al. (2003), o DNA mitocondrial (mtDNA), apesar de ser extremamente
496 informativo, possui limitações em estudos evolutivos por não detectar o fluxo gênico mediado

497 pelo macho, que é de fundamental importância na evolução dos animais domésticos. Assim, é
498 importante pesquisas que analisem tanto a herança materna quanto a paterna, por meio de
499 análises moleculares do cromossomo Y.

500 Até o momento não existem trabalhos relatando a filogenia das raças naturalizadas e exóticas
501 do Estado do Mato Grosso do Sul, portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação
502 existente nas populações de ovinos pertencentes a seis raças utilizadas no Estado por meio de
503 análises moleculares de genes do DNA mitocondrial e do cromossomo Y, a fim de se
504 investigar a possível origem desses animais e assim gerar informações sobre a filogenia dos
505 mesmos.

506

507 **Material e métodos**

508 **Animais e coleta de sangue**

509 Amostras de sangue de animais pertencentes a seis raças de ovinos criadas no Estado do Mato
510 Grosso do Sul, foram coletadas por punção da veia jugular em tubos para coleta de sangue
511 (Vacutainer®) de 4.5mL, contendo anticoagulante K3 EDTA. As amostras foram mantidas
512 sob refrigeração até a realização da extração do DNA.

513 Os dados referentes ao local de coleta e ao número amostral para as análises com o mtDNA e
514 com o CrY para cada raça foram demonstrados na Tabela 1.

515

516 **Extração de DNA e quantificação**

517 A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção
518 Animal, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados
519 (FCA/UFGD), utilizando protocolo de extração de DNA de sangue total descrito por Crispim
520 et al. (2012).

521 A qualidade do DNA foi observada por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado
 522 com brometo de etídeo. Além disso, dados referentes à quantidade de DNA (ng/ μ L) e
 523 qualidade (razão de 260/280 nm) foram obtidos por meio de espectrofotometria.

524
 525

Tabela 1. Raças utilizadas, número de indivíduos por raça e localde coleta dos animais.

Raças	Sigla	Número de indivíduos		Local de Coleta*
		mtDNA	CrY ^b	
Pantaneira ^a	PT	15	8	Faz. Experimental UFGD – Dourados/MS; Embrapa Corumbá/MS
Bergamácia	BE	5	3	Retiro dos Leite – Jardim/MS
Ile de France	IF	6	2	Faz. Chancan – Campo Grande/MS
Dorper	DP	5	-	Cabanha Morena – Caarapó/MS
White Dorper	WD	4	-	Cabanha Morena – Caarapó/MS
Hampshire Down	HS	5	2	Faz. Mate Laranjeira – Ponta Porã/MS
TOTAL		40	15	

526 a O material dos animais da raça Pantaneira foi coletado de rebanhos de duas fazendas distintas, porém após análises com os mesmos verificou-se que não havia
 527 diferença genética entre eles e, por isso, foram analisados como um grupo só. Ambos os rebanhos onde foi feita a coleta eram formados por animais adquiridos
 528 de diversos locais;

529 ^b Raças que não possuíam animais machos para análise foram representados com -.
 530

531

532 Marcadores moleculares

533 O DNA extraído foi utilizado para se realizar a amplificação dos fragmentos de três
 534 marcadores moleculares do mtDNA e dois do cromossomo Y utilizando-se os
 535 oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* que foram descritos na Tabela 2. Os marcadores do
 536 mtDNA foram a subunidade 5 do NADH desidrogenase (ND5), o gene citocromo b (CytB) e

537 a região controle (D-loop), já os marcadores do cromossomo Y foram o gene determinante do
538 sexo (SRY) e o microssatélite M18.

539 As reações de cadeia pela polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reactions* (PCRs) foram
540 realizadas em um volume final de 25 µL e a mistura para amplificação constituiu-se de: 7,5
541 µL de água ultra-pura, 1,5 µL de cada *primer* (10 pmoles), 12,5 µL de PCR Master Mix
542 (Fermentas®), 2,0 µL de DNA (10-20ng). As reações de PCR foram realizadas em
543 termociclador BIORAD modelo *MyCycler™ thermal cycler*. As temperaturas de anelamento
544 de cada reação e o tamanho do fragmento (em pares de base) gerado por cada marcador
545 também foram descritos na Tabela 2.

546 Os fragmentos amplificados para os marcadores do mtDNA e do gene SRY foram
547 visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.
548 Os alelos gerados pela PCR do microssatélite M18 foram visualizados por meio de
549 eletroforese vertical em gel de acrilamida desnaturante 7% corado com nitrato de prata.

550

551 **Purificação**

552 As amostras amplificadas, exceto as do microssatélite M18, foram purificadas seguindo o
553 protocolo fenol/clorofórmio descrito a seguir: colocou-se 12 µL de produto de PCR
554 amplificado e 12 µL de fenol/clorofórmio (1:1). A solução foi agitada por 1 min em *vortex* e
555 centrifugada à temperatura ambiente por 3 min a 14.000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e
556 a ela adicionou-se 250 µL de clorofórmio. Agitou-se novamente por 1 min em *vortex* e
557 centrifugou-se a temperatura ambiente por 3 min a 14.000 rpm. Recuperou-se a fase aquosa e
558 adicionou-se 1/10 do volume (1,2 µL) de acetato de sódio pH 5,2 a 3M e 2,5 vezes do volume
559 (30 µL) de etanol 95%. A solução foi mantida a -20°C *overnight* e então centrifugada a 4°C
560 por 15 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 70% e
561 centrifugou-se a temperatura ambiente por 15 min a 14.000 rpm. O DNA precipitado foi seco

562 à temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de TE 10:1 (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM
563 EDTA pH 8,0).

564 **Tabela 2.** Primers utilizados nas reações de amplificação, tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) e
565 temperatura de anelamento para cada marcador.

Região/marcador	Primers (5'- 3')	Fragmento (pb)	Temp. de anelamento (°C)
mtDNA			
CytB F ¹	ACCTCCTTTCAGCAATTCCA	765	60°C
CytB R ¹	AGGGAGGTTGGTTGTTCTCC		
ND5 F ²	AATAGTTTATCCAGTTGGTCTTAGG	657	52°C
ND5 R ²	AAGATTTGTTGGAGATCTCAGGTG		
D-loop F*	ACAAACCCACATAACAACCC	716	60°C
D-loop R*	GGCTGATTAGTCATTAGTCCA		
CrY			
SRY F ³	TCAGTAGCTTAGGTACATTCA	619	60°C
SRY R ³	GTGCTACATAAATATGATCTGC		
M18 F ⁴	GGCATCACAAACAGGATCAGCAAT	140-155	52°C
M18 R ⁴	GTGATGGCAGTTCTCACAATCTCCT		

566 F = forward; R = reverse. ¹Pedrosa et al. (2005); ²Tserenbataa et al. (2004); ³Meadows et al. (2004); ⁴Meadows et
567 al. (2006); *Desenhados com o programa Perl Primer a partir da sequência AF010406 (Hiendleder et al., 1998).
568

569 Sequenciamento

570 O sequenciamento foi realizado no Centro de Recursos e Biologia Genômica (CREBIO) da
571 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) de Jaboticabal pela técnica
572 de sequenciamento de Sanger (Sanger et al., 1977) em sequenciador automático ABI 3730 XL
573 (Applied Biosystems) pelo programa Data Collection v3.0 (Life Technologies). A leitura das
574 sequências foi feita pelo programa Sequencing Analysis v5.3.1 (Life Technologies).

575

576 Análise de dados

577 DNA mitocondrial

578 As sequências foram editadas e alinhadas no programa DNA Alignment (*Fluxus Technology*
579 *Ltd* – www.fluxus-engineering.com) com a sequência referência AF010406 (Hiendleder et al.,
580 1998).

581 A análise de variância molecular (AMOVA), as estatísticas F de Wright (F_{ST}), a diversidade
582 haplotípica (H) e nucleotídica (π) foram calculadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e
583 Lischer, 2010). A relação entre os haplótipos gerados foram estimadas através da construção
584 de redes haplotípicas pelo programa Network versão 4.1.1.2 (*Fluxus Technology Ltd* –
585 www.fluxus-engineering.com) com o método *Median-Joining* (Bandelt et al., 1999).

586 Para realização das análises os animais foram agrupados em três grupos diferentes: 1 – cada
587 população do MS individualmente; 2 – raças naturalizadas x raças exóticas; 3 – populações do
588 MS x sequências referência do GenBank. Considerou-se como raça naturalizada os animais
589 das raças Pantaneira e Bergamácia, e as raças Dorper, White Dorper, Ile de France e
590 Hampshire Down foram consideradas como exóticas. Para as análises do Grupo 3, utilizaram-
591 se sequências representantes de cada um dos cinco haplogrupos existentes HA, HB, HC, HD e
592 HE depositadas no GenBank sob os números de acesso KF302446 (raça Merinizzata Italiana),
593 KF302447.1 (raça Lacaune) (Lancioni et al., 2013), HM236178 (raça Karakas), HM236180
594 (raça Morkaraman) e HM236182 (raça Awassi) (Meadows et al., 2011), respectivamente.

595

596 **Cromossomo Y**

597 As sequências do gene SRY foram editadas e alinhadas no programa DNA Alignment (*Fluxus*
598 *Technology Ltd* – www.fluxus-engineering.com) com a sequência referência AY604734
599 (Meadows et al., 2004). A identificação de polimorfismos de base única, do inglês *Single*
600 *Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) nas sequências foi feita de acordo com a classificação
601 dada por Meadows e Kijas (2009).

602 A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificar a variação genética
603 dentro e entre as populações e as estatísticas F de Wright (F_{ST}) no programa Arlequin 3.5
604 (Excoffier e Lischer et al., 2010).

605 Os alelos encontrados para o microssatélite M18 foram analisados juntamente com as
606 sequências do gene SRY, sendo que cada genótipo encontrado para o gene foi associado a um
607 alelo para que a análise pudesse ser feita dessa maneira. A análise de variância molecular
608 (AMOVA) foi realizada para verificar a variação genética dentro e entre as populações e as
609 estatísticas F de Wright (F_{ST}) no programa Arlequin 3.5.

610

611 **Resultados**

612 **DNA mitocondrial**

613 **Análise de haplótipos**

614 Um total de 40 sequências de 1350 pb foram analisadas nesse estudo com o mtDNA e foram
615 encontrados 19 haplótipos nas populações do Estado do Mato Grosso do Sul. Quando
616 analisadas em conjunto com as sequências referência do GenBank, encontraram-se 24
617 haplótipos para o total de 45 sequências. Dados relacionados à diversidade haplotípica (H) e
618 nucleotídica (π) para cada raça baseados em análise dos diferentes genes do DNA
619 mitocondrial estão descritos na Tabela 3.

620

621 **Análise de variância molecular**

622 Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para os três grupos, analisados
623 com os diferentes genes do DNA mitocondrial, estão representados na Tabela 4.

624 A matriz de distância obtida pelos valores de F_{ST} no programa Arlequin 3.5 para as
625 populações do Estado do Mato Grosso do Sul individualmente (Grupo 1) mostrou distância
626 entre os animais da raça Pantaneira e os da raça White Dorper (0,23), bem como da raça

627 Bergamácia e da raça Dorper (0,24). A distância encontrada entre os animais das raças
 628 naturalizadas e os das raças exóticas (Grupo 2) não foi significativa (0,04). Quando analisadas
 629 com as sequências referência do GenBank (Grupo 3), houve distância apenas entre os animais
 630 das raças Bergamácia e Dorper (0,24). As diferenças relatadas para os Grupos 1 e 3 foram
 631 significativas ($p < 0,05$).

632

633 **Tabela 3.** Diversidade haplotípica (H) e nucleotídica (π) para cada raça das populações do Estado do Mato
 634 Grosso do Sul baseados em análise dos diferentes genes do DNA mitocondrial.

Raça	H	π
PT	0,8571±0,0645	0,002427±0,001483
BE	0,7000±0,2184	0,002370±0,001714
DP	0,9000±0,1610	0,001185±0,000977
IF	0,9333±0,1217	0,003802±0,002477
HS	0,7000±0,2184	0,002222±0,001623
WD	1,0000±0,1768	0,003827±0,002795

635

636 **Tabela 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) das populações do Estado do Mato Grosso do Sul
 637 analisadas com os diferentes genes do DNA mitocondrial.

Marcador	Grupos^a	% de variação e G.L.^b		F_{ST}[*]
		Entre populações	Dentro das populações	
mtDNA	1	8,46%; 5	91,54%; 34	0,08
	2	4,06%; 1	95,94%; 38	0,04
	3	66,22%; 10	33,78%; 34	0,66

638 ^a 1 – cada população do MS individualmente; 2 – raças naturalizadas x raças exóticas; 3 – populações do MS x
 639 sequências referência do GenBank.

640 ^b G.L. – Grau de liberdade;

641 ^{*} F_{ST} – índice de diferenciação.

642

643

644 **Estrutura das populações**

645 As Figuras 1 e 2 mostram as redes haplotípicas construídas para as populações do Estado do
646 Mato Grosso do Sul individualmente e em conjunto com as sequências do GenBank, com
647 base nos pontos mutacionais presentes nas sequências, demonstrando a relação entre os
648 diferentes haplótipos formados.

649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688

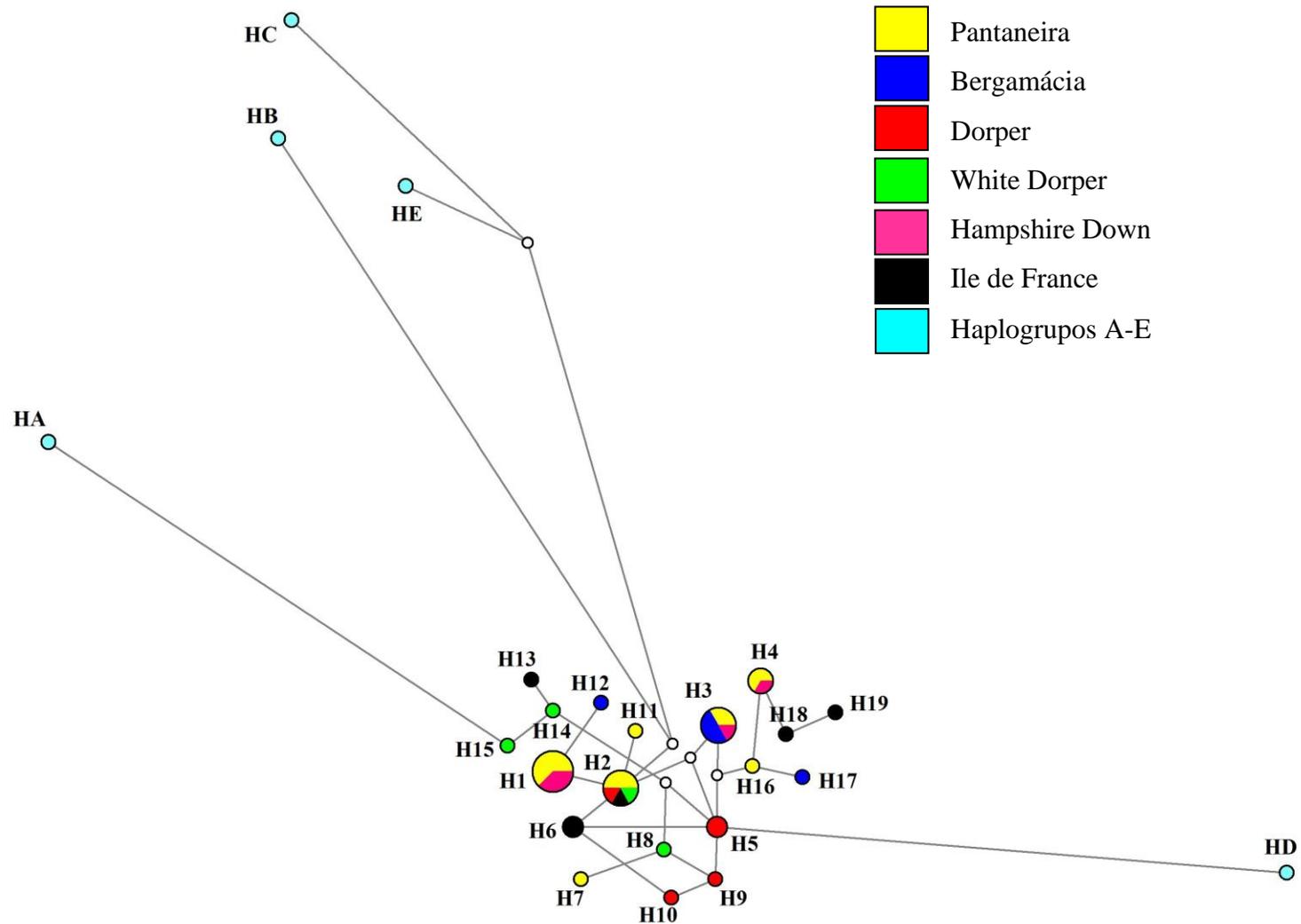


Fig. 1. Network formado pelo método de *median-joining* (Bandelt et al., 1999) demonstrando os 24 haplótipos encontrados com os diferentes genes do mtDNA para as sequências referência do GenBank (HA, HB, HC, HD e HE) e as populações do Estado do Mato Grosso do Sul. A área dos círculos dos haplótipos é proporcional a sua frequência. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplótipo. Os pontos brancos são vetores médios que representam haplótipos hipotéticos introduzidos pelo algoritmo executado.

689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729

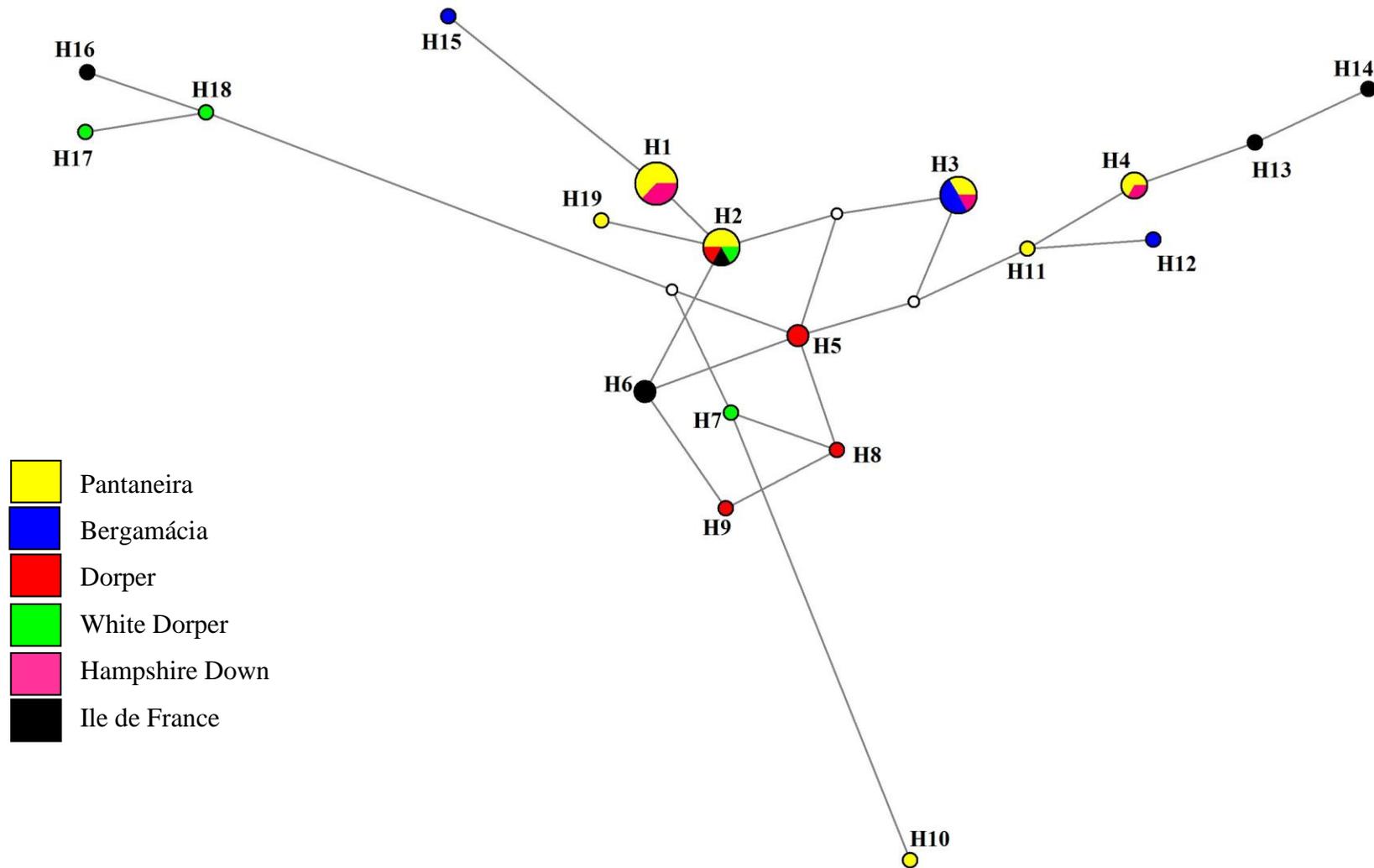


Fig. 2. Network formado pelo método de *median-joining* (Bandelt et al., 1999) demonstrando os 19 haplótipos encontrados com os diferentes genes do mtDNA para as populações do Estado do Mato Grosso do Sul. A área dos círculos dos haplótipos é proporcional a sua frequência. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplótipo. Os pontos brancos são vetores médios que representam haplótipos hipotéticos introduzidos pelo algoritmo executado.

730 **Cromossomo Y**

731 **Análise de SNPs**

732 Apenas um SNP foi encontrado (G>A) na população dos 15 machos analisados. O referido SNP se
733 caracteriza como mutação pontual do tipo transição onde houve a troca de uma base púrica (G) por
734 outra base púrica (A), não havendo troca do aminoácido final.

735 Nove indivíduos apresentaram o polimorfismo, sendo que 6 eram da raça Pantaneira, 3 da
736 Bergamácia. Os 6 animais restantes foram similares a sequência referência (AY604734), ou seja,
737 com G na sua constituição, sendo 2 pertencentes a raça Pantaneira, 2 a Hampshire Down e 2 a Ile de
738 France.

739

740 **Análise do microssatélite**

741 A análise com o microssatélite M18 encontrou dois alelos: 145 e 150. Todos os indivíduos que
742 tinham o alelo 145 apresentaram o SNP G>A, ou seja, seis animais da raça Pantaneira e três animais
743 da raça Bergamácia. Já o alelo 150 foi encontrado nos animais que não apresentaram o SNP, sendo
744 dois da raça Pantaneira, dois da Hampshire Down e dois da Ile de France.

745

746 **Análise de variância molecular**

747 A análise de variância molecular (AMOVA) com o marcador SRY não mostrou diferença
748 significativa entre as populações do Estado do Mato Grosso do Sul, porém na análise em conjunto
749 com o microssatélite M18 observou-se que havia diferença significativa entre os indivíduos da raça
750 Pantaneira e da raça Hampshire Down (0,45). Os resultados para a AMOVA tanto do marcador
751 SRY individualmente quanto com o microssatélite M18 estão descritos na Tabela 5.

752

753

754

755
756
757

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) das populações analisadas com os marcadores SRY e microssatélite M18.

Marcador	% de variação e G.L. ^a		F _{ST} [*]
	Entre populações	Dentro das populações	
SRY	45,15%;3	54,85%; 11	0,45
SRY/M18	53,55%; 3	46,45%; 26	0,53

758 ^aG.L. – Grau de liberdade;

759 ^{*}F_{ST} – índice de diferenciação

760

761 **Discussão**

762 **DNA mitocondrial**

763 **Análise de haplótipos**

764 Com base nos resultados da Tabela 3 foi possível verificar a variabilidade do mtDNA nas
765 populações de ovinos do Estado do Mato Grosso do Sul, visto que os indivíduos se distribuíram em
766 19 haplótipos. A raça White Dorper apresentou o maior valor de diversidade haplotípica, pois cada
767 animal analisado foi identificado como um haplótipo, sendo assim 04 haplótipos. As demais raças
768 também apresentaram valores altos de diversidade haplotípica sendo que a raça Pantaneira foi a que
769 se distribuiu mais, estando presente em 07 haplótipos.

770 Paiva et al. (2011) encontraram 16 haplótipos utilizando a região controle do mtDNA em estudo
771 com uma população de ovelhas brasileiras da raça Somali, resultado que difere do encontrado nesse
772 estudo por se tratar da análise de apenas uma raça enquanto que neste foram estudadas seis raças
773 diferentes. Lancioni et al. (2013) encontrou índices de diversidade haplotípica similares aos
774 encontrados neste estudo, sendo acima de 0,97 para todas as raças.

775

776 **Análise de variância molecular**

777 Hartl e Clark (2010) sugeriram as seguintes orientações para interpretação do F_{ST} : 0 – 0,05 pequena
778 diferenciação genética; 0,05 – 0,15 diferenciação genética moderada; 0,15 – 0,25 grande
779 diferenciação genética e acima de 0,25 diferenciação genética muito grande.

780 De acordo com esses autores, o valor de F_{ST} encontrado para o Grupo 1, onde foram analisadas
781 somente as populações do Estado do Mato Grosso do Sul, indicou diferenciação genética moderada
782 (0,08). No Grupo 2 (raças naturalizadas x raças exóticas) houve pequena diferenciação genética
783 entre os animais (0,04). E no Grupo 3, onde foram analisadas as sequências referência do GenBank
784 juntamente com as desse estudo, o valor de F_{ST} foi de 0,66 indicando diferenciação genética muito
785 grande. Nos grupos onde a diferenciação genética foi de moderada a muito grande também houve
786 distância genética significativa entre os indivíduos ($P < 0,05$).

787 A análise da matriz de distância formada pelos valores de F_{ST} mostrou distância significativa entre
788 as raças Pantaneira e White Dorper (0,23) no Grupo 1 e entre Bergamácia e Dorper (0,24) nos
789 Grupos 1 e 3. Os animais da raça White Dorper são oriundos da África do Sul e surgiram de
790 cruzamentos onde um dos parentais era de origem asiática (ARCO, 2011), sendo que alguns dos
791 animais utilizados nesse estudo foram identificados como asiáticos previamente nesse estudo, fato
792 que poderia explicar a maior diferença com a raça Pantaneira.

793 A raça Bergamácia brasileira é resultante de processos de adaptação e seleção natural dos animais
794 importados para o Brasil, sendo que a última importação ocorreu na década de 30. Desde então os
795 animais da raça Bergamácia brasileira estão isolados dos ancestrais italianos e, mesmo estando há
796 tantos anos em solo brasileiro, apenas em 1977 foi criado o padrão da raça (ARCO, 2013). A raça
797 Dorper faz parte das exóticas e é oriunda também da África do Sul, possuindo alguma herança
798 materna de origem asiática em seu genoma mitocondrial, podendo ser este o motivo da distância
799 encontrada.

800

801 **Estrutura das populações**

802 Analisando os haplótipos encontrados com o mtDNA nas Figuras 1 e 2, observou-se que a raça
803 Pantaneira esteve distribuída em 7 haplótipos e se agrupou com todas as outras raças do Estado que
804 foram analisadas. Esses resultados corroboram com os que foram encontrados por Crispim et al.
805 (2013) que, em análise de diversidade genética da raça Pantaneira e demais raças do Estado do
806 Mato Grosso do Sul por meio de microssatélites, encontraram miscigenação dentro da raça
807 Pantaneira.

808 Estudos de variação do mtDNA utilizando-se, principalmente, as regiões controle (D-loop),
809 citocromo b e citocromo oxidase I revelaram a existência de cinco haplogrupos (chamados de HA,
810 HB, HC, HD e HE) em ovelhas domésticas amostradas de diversas regiões geograficamente
811 dispersas. Os haplogrupos HD e HE foram identificados recentemente e são também os mais raros
812 encontrados apenas em ovelhas do Cáucaso e da Turquia, até o momento (Tapio et al., 2006;
813 Meadows et al., 2007). O haplogrupo HC é o segundo com a distribuição mais restrita com
814 exemplares na Ásia, no Fértil Crescente, Cáucaso e na Península Ibérica (Guo et al., 2005; Pedrosa
815 et al., 2005; Pereira et al., 2006; Tapio et al., 2006; Meadows et al., 2007). HA e HB são os
816 haplogrupos identificados com maior frequência e agrupam os animais de origem Asiática e
817 Européia, respectivamente. Ambos foram identificados pela primeira vez por Wood e Phua (1996) e
818 classificados por Hiendleder et al. (1998), mas tem sido localizados em todas as regiões geográficas
819 onde *Ovis aries* foi amostrado.

820 Os haplótipos H14 e H15 (Fig. 1), formados por animais da raça White Dorper, estiveram mais
821 próximos da sequência referência do GenBank representando o haplogrupo HA que indica origem
822 asiática, resultado que indica a possibilidade dessa raça possuir herança materna asiática em seu
823 genoma mitocondrial. Os demais haplótipos formados estiveram mais próximos, mesmo que por
824 meio dos vetores médios que representam haplótipos hipotéticos, do haplogrupo HB e indicando a
825 possível origem europeia dessas populações.

826

827 **Cromossomo Y**

828 **Análise de SNPs e microssatélite**

829 O polimorfismo encontrado (G>A) foi reportado por Meadows e Kijas (2009) juntamente com
830 outros seis diferentes, sendo chamado de oY6. Meadows et al. (2004) já haviam identificado um
831 SNP no gene SRY e, em 2006, realizaram a genotipagem desse SNP e do marcador microssatélite
832 (SRYM18), o mesmo utilizado nesse estudo, em 458 animais domésticos e 61 indivíduos de quatro
833 espécies selvagens de ovelhas e foi definido um conjunto de 11 haplótipos macho específicos.
834 Porém, não foram investigados todos os potenciais progenitores selvagens das ovelhas domésticas
835 e, por isso, foi feito outro estudo com mais animais para buscar por mais variações na região.
836 Neste estudo foi encontrado apenas um dos haplótipos identificados por Meadows e Kijas (2009),
837 sendo o haplótipo H5 correspondente ao alelo de 145 pb em *Ovis aries* presente em dezesseis
838 animais do estudo. A similaridade dos resultados encontrados com o gene SRY e o microssatélite
839 M18 poderia significar que o microssatélite está localizado próximo ao gene e, mesmo que esteja
840 dentro da região macho exclusiva, mas distante da região onde ocorreu o SNP também se justificam
841 os resultados, visto que nessa região não ocorre *crossing over*.

842

843 **Análise de variância molecular**

844 Comparando-se os valores de F_{ST} encontrados para os marcadores do mtDNA e para o gene SRY
845 nas populações analisadas, foi possível notar grande diferença entre o nível de diferenciação
846 genética encontrado sendo o mesmo bem mais alto para os marcadores nucleares do cromossomo
847 Y. Uma possível explicação seria a diferença na taxa de fixação do DNA nuclear e mitocondrial. Na
848 maioria das criações de animais domésticos, o fluxo gênico é mediado pelos machos por meio da
849 troca de reprodutores ou compra de sêmen, dessa forma a herança paterna está em constante
850 renovação. Como a herança mitocondrial é materna, a introdução de novos machos nos rebanhos

851 influencia apenas o genoma nuclear, aumentando assim a taxa de fixação entre diferentes grupos e
852 resultando em diferentes valores de F_{ST} encontrados neste estudo para esse marcador.

853

854 **Conclusão**

855 A análise do DNA mitocondrial permitiu inferir um primeiro panorama sobre relações filogenéticas
856 nas populações de ovinos do Estado do Mato Grosso do Sul, bem como diferenças significativas
857 entre as mesmas quando comparadas entre si e com sequências obtidas no GenBank. Pela formação
858 dos haplótipos observou-se miscigenação da raça Pantaneira e foi possível sugerir que a origem das
859 populações de ovinos do Estado do Mato Grosso do Sul analisadas seja européia.

860 Os marcadores nucleares do cromossomo Y foram eficientes em mostrar que a herança materna nos
861 animais estudados está mais conservada que a herança paterna, devido à maior diversidade
862 encontrada nos mesmos.

863 A partir do conhecimento da origem desses animais que fazem parte do patrimônio genético do
864 Estado do Mato Grosso do Sul é possível melhorar o manejo dessas raças visando sua conservação
865 e assim o melhor aproveitamento da produtividade desses animais.

866

867 **Agradecimentos**

868 À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio logístico concedido, à Fundação
869 de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul
870 (FUNDECT) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

871

872 **Conflito de interesse**

873 Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

874

875 **Referências**

876 ARCO. Assistência aos Rebanhos de Criadores de Ovinos. Associação Brasileira de Criadores de
877 Ovinos. , 2011. Disponível em: < <http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/index.asp> >. Acesso em:
878 17 de Março de 2014.

879

880 ARCO. Assistência aos Rebanhos de Criadores de Ovinos. Associação Brasileira de Criadores de
881 Ovinos. , 2013. Disponível em: < <http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/index.asp> >. Acesso em:
882 12 de Fevereiro de 2014.

883

884 Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific
885 phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16 (1), 37-48.

886

887 Crispim, B.A., Silva, D.B.S., Banari, A.C., Seno, L.O., Grisolia, A.B., 2012. Discriminação alélica
888 em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microssatélites. *J.*
889 *Selva Andina Res. Soc.*, 1 (1), 3-13.

890

891 Crispim, B.A., Grisolia, A.B., Seno, L.O., Egito, A.A., Vargas Junior, F.M., Souza, M.R., 2013.
892 Genetic diversity of locally adapted sheep from Pantanal region of Mato Grosso do Sul. *Genet. Mol.*
893 *Res.*, 12 (4), 5458-5466.

894

895 Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform
896 population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10 (3), 564-567

897

898 Grisolia, A.B., Moreno-Cotulio, V.R., 2012. Molecular Markers and Genetic Diversity in
899 Neotropical Felids. Disponível em: < [http://cdn.intechopen.com/pdfs/29257/InTech-](http://cdn.intechopen.com/pdfs/29257/InTech-Molecular_markers_and_genetic_diversity_in_neotropical_felids.pdf)
900 [Molecular_markers_and_genetic_diversity_in_neotropical_felids.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/29257/InTech-Molecular_markers_and_genetic_diversity_in_neotropical_felids.pdf) >. Acesso em: 20 de Março

901 de 2014.

902

903 Guo, J., Du, L.X., Ma, Y.H., Guan, W.J., Li, H.B., Zhao, Q.J., Li, X., Rao, S.Q., 2005. A novel
904 maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Anim. Genet.*, 36 (4), 331-336.

905 Hartl, D.L., Clark, A.G., 2010. *Princípios de genética de populações*. Ed. Artmedes.

906

907 Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R., Janke A., 1998. The complete mitochondrial DNA
908 sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype.
909 *J. Mol. Evol.*, 47, 441-448.

910

911 Lancioni, H., Di Lorenzo, P., Ceccobelli, S., Perego, U.A., Miglio, A., Landi, V., Antognoni, M.T.,
912 Sarti, F.M., Lasagna, E., Achilli, A., 2013. Phylogenetic relationships of three Italian merino-
913 derived sheep breeds evaluated through a complete mitogenome analysis. *PLoS One*, 8 (9), 1-10.

914

915 Mariante, A.S., Albuquerque, M.S.M., Egito, A.A., McManus, C., 1999. Advances in the Brazilian
916 animal genetic resources conservation programme. *AGRI*, 25 (1), 107-121.

917

918 Meadows, J.R.S., Hawken, R.J., Kijas, J.W., 2004. Nucleotide diversity on the ovine Y
919 chromosome. *Anim. Genet.*, 35 (5), 379-385.

920

921 Meadows, J.R.S., Hanotte, O., Drogemuller, C., Calvo, J., Godfrey, R., Coltman, D., Maddox, J.F.,
922 Marzanov, N., Kantanen, J., Kijas, J.W., 2006. Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in
923 wild and domestic sheep. *Anim. Genet.*, 37 (5), 444-453.

924

925 Meadows, J.R.S., Cemal, I., Karaca, O., Gootwine, E., Kijas, J.W., 2007. Five ovine mitochondrial

926 lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics*, 175 (3), 1371-1379.

927

928 Meadows, J.R.S., Kijas, J.W., 2009. Re-sequencing regions of the ovine Y chromosome in domestic
929 and wild sheep reveals novel paternal haplotypes. *Anim. Genet.*, 40 (1), 119-123.

930

931 Paiva, S.R. Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas
932 moleculares. 2005a. 118 f. Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de
933 Viçosa, Viçosa.

934

935 Paiva, S.R., Silvério, V.C., Paiva, D.A.F., McManus, C., Egito, A.A., Mariante A.S., Castro, S.R.,
936 Albuquerque, M.S.M., Dergam, J.A., 2005b. Origin of the main locally adapted sheep breeds of
937 Brazil: A RFLP-PCR molecular analysis. *Arch. Zootec.*, 54, 395-399.

938

939 Paiva, S.R., Facó, O., Faria, D.A., Lacerda, T., Barretto, G.B., Carneiro, P.L.S., Lobo, R.N.B.,
940 McManus, C., 2011. Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic
941 resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop. Anim. Health Prod.*, 43, 1449-1457.

942

943 Pedrosa, S., Uzun, M., Arranz, J.J., Gutiérrez-Gil, B., Primitivo, F.S., Bayón, Y., 2005. Evidence of
944 three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc. Biol.*
945 *Sci.*, 272, 2211-2217.

946

947 Pereira, F., Davis, S.J.M., Pereira, L., McEvoy, B., Bradley, D.G., Amorim, A., 2006. Genetic
948 signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol. Biol. Evol.*, 23,
949 1420-1426.

950

951 Rosa, A.D.M., Paiva, S., 2009. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais
952 de espécies de interesse zootécnico. Embrapa Cerrados, Documentos.
953
954 Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
955 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (12), 5463-5467.
956
957 Tapio, M., Marzanov, N., Ozerov, M., C'inkulov, M., Gonzarenko, G., Kiselyova, T., Murawski,
958 M., Viinalass, H., Kantanen, J., 2006. Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian,
959 and Central Asian areas. Mol. Biol. Evol., 23 (9), 1776-1783.
960
961 Tserenbataa, T., Ramey, R.R., Ryder, O.A., Quinn, T.W., Reading, R.P., 2004. A population
962 genetic comparison of argali sheep (*Ovis ammon*) in Mongolia using the ND5 gene of
963 mitochondrial DNA: implications for conservation. Mol. Ecol., 13, 1333-1339.
964
965 Wood, N.J., Phua, S.H., 1996. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial
966 genome. Anim. Genet., 27 (1), 25-33.

967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983

984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015

CAPITULO III

O artigo foi aceito para publicação como *short communication* na revista **African Journal of Biotechnology**, avaliada com **Qualis B1** na área de **Biodiversidade**. Certificado de aceite em anexo (Anexo III).

1016 **Análise de polimorfismos no gene mitocondrial ND5 em ovelhas das raças Pantaneira e**
1017 **Crioula**

1018

1019 J.A. de Oliveira^{1,*}, B.A. Crispim¹, F.M. Vargas Junior², L.O. Seno², A.A. do Egito³, A.B. Grisolia¹

1020 ¹Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados,
1021 Mato Grosso do Sul, Brasil.

1022 ²Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do
1023 Sul, Brasil.

1024 ³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

1025

1026 *Autor correspondente:

1027 Joyce Azambuja de Oliveira, J.A. de Oliveira

1028 Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados,
1029 Rodovia Dourados-Itahum Km 12, Dourados/MS, Brasil.

1030 Email: joyce_azambuja@hotmail.com

1031 Tel: +55 067 9971-3503

1032

1033 **RESUMO**

1034 O objetivo deste estudo foi avaliar a variação genética entre uma população de ovelhas da raça
1035 Pantaneira no Estado de Mato Grosso do Sul, e Crioula do Sul do país, através da análise molecular
1036 do gene ND5 no DNA mitocondrial. A análise revelou a presença de 16 haplótipos sendo que todos
1037 os animais da raça Pantaneira se agruparam em um único haplótipo e não se agruparam com
1038 nenhum animal da raça Crioula. O valor de F_{ST} foi de 0.44 indicando que existe diferença genética
1039 entre as raças analisadas, o que poderia indicar que tenha ocorrido diferenciação entre ambas.

1040

1041 **Palavras-chave:** *Ovis aries*, gene *ND5*, diversidade genética, filogenia, diferenciação de raças.

1042

1043 **ABSTRACT**

1044 The aim of this study was to assess genetic variation between a population of Pantaneira sheep in
1045 the Brazilian state of Mato Grosso do Sul, and Creole sheep from the south of the country by
1046 molecular analysis of the *ND5* gene in mitochondrial DNA. The analysis revealed the presence of
1047 16 haplotypes with all Pantaneira sheep grouped together carrying a single haplotype, and there was
1048 no grouping with any of the Creole sheep. The F_{ST} value was 0.44, indicating that there is a genetic
1049 difference between the two breeds, which may indicate that both breeds underwent differentiation.

1050

1051 **Keywords:** *Ovis aries*, *ND5 gene*; genetic diversity; phylogeny; breed differentiation.

1052

1053 **Introdução**

1054 O Brasil possui diversas espécies de animais domésticos, incluindo os ovinos, que se
1055 desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonizadores logo após o descobrimento. Os passos
1056 iniciais para obtenção de subsídios para programas de melhoramento, manejo e conservação para as
1057 raças de ovinos naturalizados brasileiros são a caracterização da diversidade das raças naturalizadas,
1058 a relação genética entre elas, bem como o conhecimento de suas origens (Mariante and Cavalcante,
1059 2006). A raça Crioula tem sido criada por séculos no Brasil nos Estados do Rio Grande do Sul e
1060 Santa Catarina, onde existem duas variedades da raça conhecidas como Fronteira e Serrana
1061 (Gonçalves et al., 2010). Considerando a história da distribuição geográfica dos ovinos no Brasil e a
1062 semelhança fenotípica entre os animais, supõe-se que os ovinos Pantaneiros tenham se originado da
1063 raça Crioula e pesquisas têm sido realizadas para determinar se já houve diferenciação suficiente
1064 entre os grupos para que os ovinos Pantaneiros sejam reconhecidos como raça (Paiva et al., 2008).
1065 NADH desidrogenase é uma das maiores enzimas encontradas em complexos respiratórios em
1066 mamíferos. A enzima possui 42 cadeias polipeptídicas sendo que sete são codificadas pelo genoma
1067 mitocondrial. A subunidade cinco (ND5) foi utilizada por Tserenbataa et al. (2004) e por Gonçalves
1068 et al. (2010) em estudos de diversidade com ovinos. No primeiro estudo os autores buscaram
1069 encontrar subespécies de *Ovis ammon* na Mongólia por meio do sequenciamento dessa região e os
1070 resultados sugeriram a possibilidade da existência de duas subespécies (*O. ammon ammon* e *O.*
1071 *ammon darwini*). No estudo de Gonçalves et al. (2010), foi encontrada diferenciação genética entre
1072 animais da raça Crioula no Sul do Brasil, pertencendo as variedades Serrana e Fronteira. Genetic
1073 polymorphisms in mitochondrial DNA (mtDNA) reveal haplotype diversity within species, and are
1074 therefore, a useful tool for establishing phylogenetic relationships at the species level (Avise et al.,
1075 1987). Therefore, the aim of this study was to assess the variation between a population of
1076 Pantaneira sheep in the state of Mato Grosso do Sul and Crioula sheep in the south of Brazil
1077 through molecular analysis of the mtDNA ND5 region.

1078 **Material e métodos**

1079 Amostras de sangue de 19 animais pertencentes à raça Pantaneira no Estado do Mato Grosso do Sul
1080 foram coletadas e armazenadas a 4°C. O DNA foi extraído no Laboratório de Biotecnologia
1081 Aplicada à Produção Animal (Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande
1082 Dourados) utilizando protocolo de extração de DNA de sangue total descrito por Crispim et al.
1083 (2012). Uma região de 657 pb do gene mitocondrial *ND5* foi ampliada utilizando os *primers* ND5
1084 F 5'-AATAGTTTATCCAGTTGGTCTTAGG-3' e ND5 R 5'-
1085 AAGATTTGTTGGAGATCTCAGGTG-3' (Tserenbataa et al., 2004). A reação de cadeia pela
1086 polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi realizada em um volume final de 25
1087 µL e o mix de amplificação foi feito com 7,5 µL de água ultra pura, 1,5 µL de cada *primer* (10
1088 pmoles), 12,5 µL de PCR Master Mix (Fermentas[®]) e 2,0 µL de DNA (10 – 20 ng). O protocolo da
1089 reação foi 95° C (5 min) um ciclo; 95° C (1 min), 52° C (1 min), 72° C (1 min 30 s) 36 ciclos e 72° C
1090 (10 min) um ciclo. Os fragmentos amplificados foram purificados e sequenciados em sequenciador
1091 automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems). A edição e o alinhamento das sequências foi feito
1092 com a sequência referência AF010406 (Hiendleder et al., 1998) utilizando o programa DNA
1093 Alignment (Fluxus Technology Ltd). Para o estudo comparativo entre as raças Pantaneira e Crioula,
1094 sequências de 17 animais da raça Crioula foram obtidas no GenBank sob os número de acesso
1095 EU854593 a EU854607 e EU854609-EU854610 (Gonçalves et al., 2010). A análise de variância
1096 molecular (AMOVA), as estatísticas F de Wright (F_{ST}), diversidade haplotípica e nucleotídica
1097 foram calculadas usando o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). As relações entre os
1098 haplótipos obtidos foram analisadas pela construção de redes haplotípicas usando o programa
1099 Network versão 4.1.1.2 (Fluxus Technology Ltd) pelo método de *Median-Joining* (Bandelt et al.,
1100 1999).

1101

1102 **Resultados**

1103 Um total de 36 sequências foram analisadas utilizando o gene ND5 do mtDNA. Dezesesseis
1104 haplótipos foram encontrados, sendo que os animais da raça Pantaneira se agruparam todos em um
1105 único haplótipo. A Tabela 1 mostra comparações entre as sequências de DNA dos diferentes
1106 haplótipos. AMOVA mostrou que a porcentagem de variação entre as populações analisadas foi de
1107 44,44% e dentro das populações foi de 55,56% ($p < 0.05$). O valor de F_{ST} encontrado foi 0,44, valor
1108 que indica diferença genética de acordo com Hartl e Clark (2010). Também foi encontrada
1109 diferença significativa ($p < 0.05$) entre os animais da raça Pantaneira e das duas variedades da raça
1110 Crioula e a distância entre as raças foi de 0,44, de acordo com o método de distância *pairwise*
1111 *difference* baseado nos valores de F_{ST} calculados com AMOVA. A Figura 1 mostra as redes
1112 haplotípicas construídas para os indivíduos das raças Pantaneira e Crioula, com base nos pontos
1113 mutacionais presentes nas sequências, demonstrando a relação entre os diferentes haplótipos
1114 formados. A Tabela 2 mostra as diversidades haplotípica e nucleotídica calculadas com Arlequin
1115 3.5 para o gene *ND5*.

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1133 **Tabela 2.** Diversidade haplotípica (H) e nucleotídica (π) para as raças Pantaneira e Crioula
 1134 analisadas com o gene *ND5*.

Raças	H	π
Pantaneira	1.000±0.017	0.000±0.000
Crioula	1.000±0.020	0.010±0.006

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

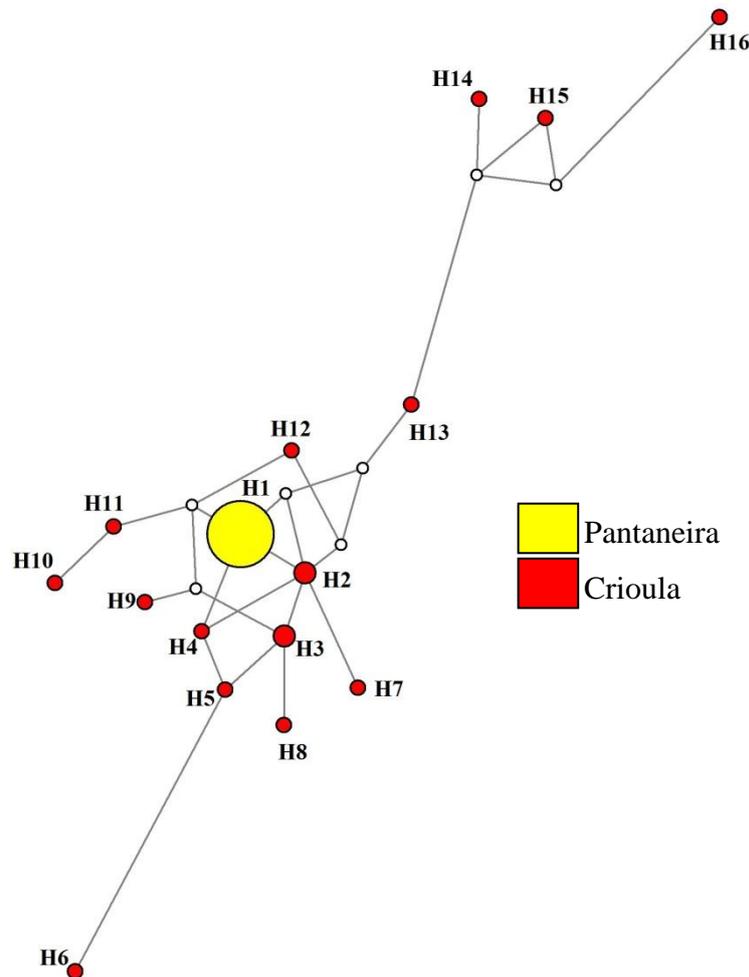
1145

1146

1147

1148

1149



1150 **Fig. 1.** Network construído pelo método de *median-joining* (Bandelt et al., 1999) demonstrando os
 1151 16 haplótipos encontrados com o gene *ND5* do mtDNA para os indivíduos das raças Pantaneira e
 1152 Crioula. A área dos círculos dos haplótipos é proporcional a sua frequência. O comprimento das
 1153 linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplótipo. Os pontos brancos são
 1154 vetores médios que representam haplótipos hipotéticos introduzidos pelo algoritmo executado.

1155 **Discussão**

1156 O valor de F_{ST} encontrado nesse estudo com o gene *ND5*, calculado com AMOVA, foi de 0.44 e de
1157 acordo com Hartl e Clark (2010), valores de F_{ST} acima de 0.25 indicam diferença genética. Portanto,
1158 pode-se inferir que houve diferenciação entre as raças Pantaneira e Crioula quando analisadas com
1159 esse marcador. Além disso, Holsinger e Weir (2009) disseram que se o valor de F_{ST} é alto, a
1160 frequência alélica é diferente indicando diferença entre populações, o que novamente mostra que
1161 pode ter havido diferenciação entre as populações estudadas. A rede haplotípica (Fig. 1) formada
1162 mostrou que os animais da raça Crioula possuem um haplótipo diferente dos animais da raça
1163 Pantaneira, visto que não se agruparam juntos, sugerindo que tenha ocorrido diferenciação entre
1164 esses grupos, portanto mais pesquisas seriam necessárias para saber se isso foi o suficiente para que
1165 a ovelha Pantaneira possa ser reconhecida como uma raça separada, sugestão feita também por
1166 Paiva et al. (2008). Entretanto, também foi possível observar que vários haplótipos formados para a
1167 raça Crioula ficaram próximos do haplótipo formado pelos animais da raça Pantaneira o que poderia
1168 indicar que, apesar desses animais não compartilharem o mesmo haplótipo, fazem parte de um
1169 mesmo haplogrupo. O fato de todos os animais da raça Pantaneira se agruparem juntos em um
1170 único haplótipo explica os valores encontrados para diversidade haplotípica e nucleotídica (Tabela
1171 1). A região onde hoje se encontram esses animais pertencia anteriormente ao Paraguai, assim é
1172 possível que a raça Pantaneira tenha sofrido influência de rebanhos paraguaios e a análise de seu
1173 genoma mitocondrial pode resgatar essa história mostrando sua distância genética da raça Crioula.
1174 Assim, a existência de diferenças significativas para o gene *ND5* do mtDNA entre as raças
1175 Pantaneira e Crioula poderia indicar que tenha ocorrido diferenciação entre ambas, porém pesquisas
1176 adicionais utilizando outros marcadores seriam necessárias para comprovar a diferenciação entre
1177 Pantaneira e Crioula.

1178

1179 **Agradecimentos**

1180 À Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio logístico concedido e à Fundação
1181 de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul
1182 (FUNDECT) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

1183

1184 **Conflito de interesse**

1185 Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

1186

1187 **Referências**

1188 Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987).
1189 Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and
1190 systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.

1191

1192 Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific
1193 phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.

1194

1195 Crispim BA, Silva DBS, Banari AC, Seno LO, Grisolia AB (2012). Allelic discrimination in
1196 naturalized ovine from Pantanal Sul-Matogrossense by means of microsatellite markers. *J. Selva
1197 Andina Res. Soc.* 1(1): 3-13.

1198

1199 Excoffier L, Lischer HE (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform
1200 population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.

1201

1202 Gonçalves GL, Moreira GR, Freitas TR, Hepp D, Passos DT, Weimer TA (2010). Mitochondrial
1203 and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. *Anim.
1204 Genet.* 41: 308-310.

1205

1206 Hartl DL, Clark AG (2010). *Population genetics principles*. Porto Alegre: Artmed. 660 p.

1207

1208 Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998). The complete mitochondrial DNA
1209 sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype.
1210 *J. Mol. Evol.* 47: 441-448.

1211

1212 Holsinger KE, Weir BS (2009). Genetics in geographically structured populations: defining,
1213 estimating and interpreting F_{ST} . *Nat. Rev. Genet.* 10: 639-650.

1214

1215 Mariante, AS, Cavalcante N (2006). *Animals of the discovery: Domestic breeds in the history of
1216 Brazil*. Brasília: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. 232 p.

1217

1218 Paiva SR, Santos S, Vilarinho KR (2008). Origin and genetic diversity of the crioulo sheep in
1219 Pantanal-MS. Partial report regarding research activities between Embrapa Pantanal and Embrapa
1220 Genetic Resources and Biotechnology. Brasília: Embrapa.

1221

1222 Tserenbataa T, Ramey RR, Ryder OA, Quinn TW, Reading RP (2004). A population genetic
1223 comparison of argali sheep (*Ovis ammon*) in Mongolia using the ND5 gene of mitochondrial DNA:
1224 implications for conservation. Mol. Ecol. 13: 1333-1339.
1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

1247

1248

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises realizadas com os diferentes genes do DNA mitocondrial e do cromossomo Y contribuíram para gerar informações a respeito da filogenia de algumas das raças de ovinos utilizadas no Estado do Mato Grosso do Sul.

Após comparações com sequências referência obtidas no GenBank, foi possível sugerir que a origem das raças de ovinos do Estado seria europeia. Observou-se que a herança materna nesses animais está mais conservada do que a paterna, pois os resultados obtidos na análise do cromossomo Y mostrou maior diversidade.

É necessária a realização de mais estudos, com mais marcadores, com a raça Pantaneira e a raça Crioula do Sul do Brasil de modo a se comprovar se ambas são diferentes. O estudo mostrou que as duas são distantes e que há diferenciação genética muito grande entre elas.

A partir da formação dos haplótipos, foi possível observar grande miscigenação na raça Pantaneira visto que foi a que mais se distribuiu e agrupou com as demais.

ANEXOS

ANEXO I

Normas da revista *Genetics and Molecular Biology*/Qualis B2 – Biodiversidade (Capítulo I)

SUBMISSION OF PAPERS

1. For submission the following instructions must be observed:

- The manuscript must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file. Furthermore, a cover letter addressed to the Editor is required. It must be edited by the corresponding author inserted within the reserved data field.
- Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed.
- The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and not-preferred reviewer(s).
- Files must be uploaded separately and identified according to file types. The main text file must include references and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.h).
- Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

2. Categories of Contribution

2.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results by the reviewers and readers. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation. Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **The References Section**: References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author;

and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) *Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants*. *PLoS One* 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2009)

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the

table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file, that is the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page.

i) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

j) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

ANEXO II

Normas da revista *Livestock Science/Qualis A2 – Biodiversidade* (Capítulo II)

Types of article

1. Original Research Articles (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Position Papers
5. Technical Notes
6. Book Reviews

Original Research Articles should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. They should not occupy more than 12 Journal pages.

Article structure

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasise part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

- Title should be clear, descriptive and not too long
- Abstract
- Keywords (indexing terms)
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, and so on
- References
- Figure captions
- Figures (separate file(s))
- Tables (separate file(s))

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not be longer than 400 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of

publication;

2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

ANEXO III
Certificado de aceite de artigo (Capítulo III)

OPEN ACCESS JOURNALS
<http://www.academicjournals.org/AJB>

African Journal of Biotechnology

Acceptance Certificate

Date: 28-Jan-2015
Manuscript Number AJB/28.10.14/14284
Manuscript Title: Analysis of polymorphisms in the mitochondrial ND5 gene in Pantaneira and Crioula breeds of sheep
Corresponding Author: Joyce Azambuja de Oliveira

Corresponding Author Email joyce_azambuja@hotmail.com

Author(s): Joyce Azambuja de Oliveira

Date Accepted: 28-Jan-2015

